UNIVERSITE DE PARIS

Année 1960

T H È S E

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

en vue

de l'OBTENTION de DOCTORAT D'UNIVERSITE

par

Antoine S A R R A F

sur

RECHERCHES SUR LES AMINES DE DECARBOXYLATION PRODUITES PAR UNE BACTERIE ANAEROBIE: INFLABILIS lacustris

Préface d' A. - R. PREVOT

Chef de Service à l'Institut PASTEUR

Présentée et soutenue publiquement le 16 Juin 1960

JURY :

Monsieur le Professeur G. VALETTE
Président de Thèse

Mademoiselle le Professeur S. LAMBIN

Monsieur le Professeur A. GERMAN

EDITIONS A.G.E.M.P. - 8 rue Dante - PARIS V°

1960

UNIVERSITE DE PARIS

Année 1960

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

en vue

de l'OBTENTION de DOCTORAT D'UNIVERSITE

par

Antoine S A R R A F

sur

RECHERCHES SUR LES AMINES DE DECARBOXYLATION PRODUITES PAR UNE BACTERIE ANAEROBIE: INFLABILIS lacustris

Préface d' A. - R. PREVOT

Chef de Service à l'Institut PASTEUR

Présentée et soutenue publiquement le 16 Juin 1960

JURY :

Monsieur le Professeur G. VALETTE
Président de Thèse

Mademoiselle le Professeur S. LAMBIN

Monsieur le Professeur A. GERMAN

EDITIONS A.G.E.M.P. - 8 rue Dante - PARIS V°

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M.M. René FABRE	- Doyen , Membre de l'Institut
M. JANOT	- Assesseur
C. CUVIER	- Secrétaire Général
L. JEANDEL	- Secrétaire
A. QUILLIOT	- Secrétaire

PROFESSEURS HONORAIRES

M.M. DELEPINE	- Membre de l'Institut
LAUNOY	
FLEURY	
MASCRE	
PICON	
BEDEL	

PROFESSEURS

M.M. R. FABRE	- Membre de l'Institut ; Toxicologie
M. JANOT	- Pharmacie Galenique
G. VALETTE	- Pharmacodynamie
R. PARIS	- Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale
M. GUILLOT	- Physique
J. GAUTIER	- Chimie organique
Mlle S. LAMBIN	- Microbiologie

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538125_0028

M.M.	Y. RAOUL	- Zoologie appliquée
	J. COURTOIS	- Chimie biologique
	L. DOMANGE	- Chimie minérale
	P. CRETE	- Botanique
	R. TRUHAUT	- Toxicologie et hygiène industrielle
	A. MORETTE	- Hydrologie
	R. CAVIER	- Parasitologie
	A. QUEVAUVILLER	- Hygiène
	R. MOREAU	- Pharmacie chimique
	J. GUY	- Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques
	A. GERMAN	- Technique bactériologique
	M. PIETTE	- Biologie sanguine
	P. MALANCEAU	- Chimie analytique
	M. GIRARD	- Chimie appliquée à l'expertise
	G. DILLEMANN	- Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie

MAITRES DE CONFERENCES

M.M.	G. DEYSSON	- Cryptogamie
	J. FLAHAUT	- Minéralogie
	J. RENAULT	- Chimie organique
	P. LARUELLE	- Physique
	G. LE MOAN	- Toxicologie
	P. ROSSIGNOL	- Pharmacodynamie
	A. LE HIR	- Pharmacie galénique
	H. RENAULT	- Pharmacie chimique
	C. PAOLETTI	- Radioisotopes, Application à la Biologie et à la Pharmacie
	A. MANGEOT	- Chimie analytique
	R. DELAVEAU	- Biologie végétale
	A. DESVIGNES	- Microbiologie
	F. PERCHERON	- Biochimie

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

M.M.	J. BORY	- Serologie
	P. CORRIEZ	- Physique
	J. DUCHENNE	- Microbiologie
	J. GARDENT	- Chimie analytique (1ère Année)
	P. GESTEAU	- Physique biologique
	J. HARISPE	- Chimie générale et pharmaceutique
	J. HENRY	- Chimie (4ème année)
	M. LECLERC	- Chimie biologique
	M. LEMONNIER	- Chimie analytique (2ème et 3ème années)
Mlle	S. LONGUEVALLE	- Service des examens de chimie
M.M.	F. PELLERIN	- Chimie analytique (2ème et 3ème années)
	R. POTTIER	- Pharmacie Galénique industrielle
Mlle	A. ROLLEN	- Biologie végétale
M.	J. SAVEL	- Parasitologie

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M.	R. GOUTAREL	- Chef de travaux de pharmacotechnie galénique
Mlle	H. MORIN	- Chef de travaux de Pharmacodynamie
M.	. ROBBA	- Chef de travaux de pharmacotechnie chimique

BIBLIOTHEQUE

M.	GARNIER	- Conservateur, chargé de la direction
Mlle	LAVAUD	- Conservateur
Mmes	DESGRIPPES	- (Bibliothécaires
	KREHMER	- (

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A Monsieur le Professeur A.R. PREVOT

Chef de Service à l'Institut Pasteur

Qui a bien voulu me guider et mettre à
ma disposition tout ce qui a fallu pour
faire ce travail dans son Service
des anaérobies à l'Institut PASTEUR de
PARIS

Nous remercions Monsieur le Professeur RAYNAUD qui nous a permis de faire une partie de ce travail dans le Service de Chimie Bactérienne Institut Pasteur, Annexe de Garches, ainsi que Madame le Docteur J. BLASS pour sa collaboration précieuse.

P R E F A C E

En 1954 ayant été appelé à présider la Commission de Biologie au 4° Congrès International de la Science du Sol de Léopoldville, j'ai eu l'occasion d'admirer sur place l'oeuvre des Parcs Nationaux du Congo Belge, présidée par mon éminent collègue et ami, le Professeur VAN STRAELEN. Sous l'équateur, de Matadi à Stanleyville et à Yangambi, nous avons fait le projet d'introduire la Bactériologie à côté des autres sciences naturelles intéressées à la préservation de la Nature. Une première mission a été aussitôt organisée et grâce à H. MOLLARET, nous avons pu étudier de nombreux échantillons prélevés dans les lacs vierges et jusque là inconnus du Massif encore inexploré du Ruvenzori entre 4.000 et 5.000 m d'altitude. La moisson fut riche et complétait les recherches sur la " microflore originelle " commencées en 1946 dans les forêts primaires de Côte d'Ivoire et de Guinée, poursuivies ensuite en Terre Adélie, à l'Ilôt Tromlin, dans le Grand Nord Groënlandais et dans les forêts marécageuses du Brésil.

Parmi les espèces nouvelles étudiées, une d'entre elles, Inflabilis lacustris, nous a particulièrement interessé parce qu'elle était le prototype de ces nombreuses bactéries anaérobies, atoxinogènes et non hémolytiques, mais pathogènes, dont nous ignorons totalement le substrat de l'action létale.

Depuis mes lointaines recherches faites entre 1922 et 1933 avec A. BERTHELOT, j'avais supposé que la mort des animaux d'expérience inoculés avec leur culture était due à des poisons à petite molécule, du type " amines de décarboxylation ". Dans une conversation avec mon ami regretté M. MACHEBOEUF, je lui avais demandé de mettre au point des techniques nouvelles permettant de vérifier cette hypothèse. Sa disparition prématurée n'a pas permis de terminer avec lui cette recherche. Mais sa collaboratrice Madame BLASS ayant été affectée à mon

service de Biochimie des Anaérobies, nous avons pu reprendre le sujet quand A.SARRAF est venu me demander un sujet de thèse. J. BLASS et A. SARRAF ont heureusement mis au point une méthode simple qui permet de caractériser rapidement et exactement les amines de décarboxylation des bactéries dans les milieux anaérobies. A. SARRAF présente aujourd'hui une thèse remarquable qui servira de modèle pour les études similaires et permettra de résoudre le problème des anaérobies non toxinogènes mais pathogènes.

Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans l'aide efficace du Professeur VAN STRAELEN et sans les subventions généreuses du Fond National Belge d'Interventions Sociales et Scientifiques.

Au Comte P. de LAUNOIT et au Professeur VAN STRAELEN vont donc nos remerciements les plus vifs. Sans eux, ce chapitre de l'étude des anaérobies n'aurait pas pu être réalisé en France. Nous sommes heureux de leur témoigner ici notre très vive gratitude.

A.-R. PREVOT

I N T R O D U C T I O N

Parmi les produits de la protéolyse anaérobie, on a (1) soit des catabolites inodores (H_2, CO_2, acides, alcools, amines inodores) soit des catabolites putrides (SH_2, scatol, thioesters, amines putrides). Dans ce travail, nous avons étudié les amines de décarboxylation d'Inflabilis lacustris, pour la plupart toxiques et qui provoquent, dans le cas de certaines souches, la mort de l'animal alors que cette bactérie n'élabore pas de toxine.

Parmi les catabolites inodores, nous avons cherché à isoler dans la culture en bouillon VF glucosé de cet anaérobie ceux qui sont toxiques: la neurine CH_2 =CHN (CH_3)$_3$OH qui dérive de la choline; l'histamine (imidazoléthylamine) qui naît de la décarboxylation de la phénylalanine; la tyramine (paraoxyphényléthylamine) qui naît de la décarboxylation de la tyrosine; la tryptamine (indoléthylamine) qui naît de la décarboxylation du tryptophane. Parmi les catabolites fétides, nous avons cherché des amines fixes : la putrescine (tétraméthylénediamine) et la cadavérine (pentaméthylénediamine) et des amines volatiles méthylamine, diméthylamine, triméthylamine, éthylamine, diethylamine, triéthylamine, propylamine, butylamine, isobutylamine, isoamylamine, diisoamylamine, allylamine et phénylathylamine.

C'est A. GAUTIER qui (3) le premier, a réussi en 1881 à obtenir quelques uns de ces corps à l'état de pureté et en quantité notable sous forme de sels solubles ou insolubles d'or et de platine, à partir des tissus animaux ou végétaux en putréfaction. Depuis ces travaux, pour séparer systématiquement les unes des autres les amines biologiques que l'on rencontre dans la nature, on pouvait mettre à profit les différences de solubilité de leurs sels doubles et surtout leurs combinaisons avec le chlorure de platine et le chlorure d'or.

Depuis 1948, on a commencé à utiliser la chromatographie pour séparer ces amines. BREMMER et KENTEN en 1951 (12) ont séparé et identifié un grand nombre d'amines par la chromatographie sur papier; ils ont chromatographié les amines sous forme d'une solution aqueuse de leur chlorure, ce qui nécessite leur extraction préalable, si on veut appliquer cette méthode à l'analyse d'un milieu naturel quelconque contenant des acides aminés et des peptides. BLOCK en 1957 (14) a décrit une méthode nouvelle d'extraction des amines d'un mélange complexe à l'aide d'éther dans un appareil à extraction continue liquide-liquide; cette méthode comporte plusieurs opérations, elle est longue et se prête mal à des essais en série.

SCHWYZER en 1952 (13) a utilisé la chromatographie sur papier pour la détection, la séparation et l'identification des amines et a proposé l'alcool absolu à 0,1 à 2 p. 100 d'acide acétique glacial comme meilleur solvant pour obtenir les extractions d'amines des matières biologiques. Mais cette méthode ne peut être utilisée que pour les matières biologiques solides; elle est donc inutilisable pour les bouillons de culture qui sont miscibles à l'alcool.

BLASS, MACHEBOEUF et REBEYROTTE en 1953 (4) ont proposé l'électrophorèse pour distinguer certaines amines biologiques qui peuvent être présentes à côté des aminoacides dans les hydrolysats d'origine biologique. Ils ont également proposé l'électrophorèse comme moyen commode pour réaliser rapidement une deuxième dimension après chromatographie unidimensionnelle sur papier, pour obtenir une meilleure séparation des amino-acides et bases aminées.

BLASS, LECOMTE et POLONOVSKY en 1954 (5) ont mis au point une méthode de chromatographie suivie d'une électrophorèse dans le but de séparer et d'identifier les aminoacides et quelques amines biologiques comme l'histamine, la glucosamine et l'éthanolamine et ont appelé cette technique combinée : chromatoionophorèse.

HERBST; KEISTER et WEAVER en 1958 (9) ont étudié la séparation de certaines amines biologiques par la chromatographie sur papier et l'électrophorèse sur papier.

Dans ce travail, nous avons appliqué ces techniques de chromatographie, d'électrophorèse et chromatoionophorèse à l'analyse des bouillons de cultures des quinze souches d'Inflabilis lacustris de la collection des anaérobies lyophilisés du Professeur PREVOT à l'Institut Pasteur, Paris, sans extraction préalable des amines fixes des milieux de culture, mais après l'élimination des amines volatiles par la distillation alcaline.

CHAPITRE PREMIER

DESCRIPTION DU MICROBE (20)

Inflabilis lacustris PREVOT, THOUVENOT, PETRIGALLA et SILLICC, 1956.

Habitat : Sédiments des lacs de haute montagne du Massif du Ruvenzori (Congo Belge). Assez fréquent. Retrouvé dans des conserves de poissons et des septicémies.

Morphologie : Bâtonnet de 2 à 4 µ sur 0 µ 8 à 1 µ à des extrêmités arrondies, immobile, non cilié, non encapsulé, sporulé (spores clostridiennes rares sur milieux ordinaires, plus abondantes, parfois libres sur milieu de Ellner) Gram positif.

Physiologie : Anaérobie strict stable. Thermorésistance faible. 10 mirutes à 80°, 5 minutes à 90°, 1 minute à 100°. Très réducteur (rouge neutre et phenosafranine définitivement résuits; safranine temporairement).

Cultures : Gazogènes (gaz explosif) et fétides.

Gélose profonde : colonies lenticulaires. Gaz.

Eau peptonée : léger trouble.

Bouillon VF glucosé : trouble abondant, dépôt rapide.

Gélatine : non liquéfiée (ou très lentement liquéfiée par quelques souches).

Lait : rapidement coagulé avec ou sans réfraction alvéolaire.

Protéines coagulées : non attaquées.

Glucides : glucose, lévulose, maltose, saccharose, galactose, lactose, amidon et glycérol fortement fermentés, gaz abondant.

Caractères biochimiques : nitrates réduits en nitrites par quelques souches en présence de glycérol. Sulfites réduits en sulfures. En bouillon VF glucosé, fermentation intense acéto-butyrique (avec parfois acide supérieur) peu de SH_2; beaucoup de NH_3; amines volatils, éthanol, cétone; aldéhydes, phénol, indol, scatol. Uréase très active.

Pouvoir pathogène expérimental. Quelques souches tuent l'animal, les autres ont un pouvoir pathogène faible ou nul; sur cobaye abcès ou nécrose cutanée locale. Quelques souches produisent une hémolysine soluble peu active, pas de toxine.

CHAPITRE II

DISTILLATION DES AMINES VOLATILES

Pour faciliter l'identification des amines qui peuvent se trouver dans le bouillon de culture, on commence par séparer les amines volatiles des amines fixes par la distillation (21) sous pression réduite. On amène le bouillon de culture à pH 8 avec du carbonate de soude pour libérer les amines de leurs combinaisons avec les acides; on ajoute du talc comme antimousse (50 grammes par litre environ) on met ce bouillon dans un ballon à fond rond de trois litres de préférence, sur ce ballon on branche une boule antimousse qui reconduit la mousse formée éventuellement vers le ballon et l'empêche d'arriver jusqu'au réfrigérant. On interpose un déflegmateur avant le réfrigérant à boules. Le distillat est recueilli dans un ballon à fond rond à effilure latérale, refroidi à 0° et dans lequel on fait un vide partiel. On chauffe ce ballon aux environs de 55° dans une culotte électrique ou un bain marie pour que la chaleur se répartisse mieux, que l'ébullition soit régulière. On arrête la distillation quand il reste environ 200 ml du volume initial ce qui correspond à une concentration de 4 à 6 fois. Ce bouillon concentré est alors prêt pour l'étude des amines fixes. Le distillat doit subir avant l'étude des amines volatiles qu'il contient un certain nombre d'opérations qui seront décrites au chapitre des amines volatiles (Chapitre IV).

CHAPITRE III

AMINES FIXES

Les amines fixes suivantes ont été recherchées sous forme de chlorhydrates en solutions aqueuses 0,01 M): cadavérine, putrescine, agmatine, histamine,* tyramine, tryptamine et neurine.

La recherche de ces amines est effectuée dans le bouillon VF glucosé, débarassé de corps bactériens après sa concentration et l'élimination des bases aminées volatiles par la distillation alcaline (voir chapitre précédent : Distillation).

Le bouillon est analysé avant et après hydrolyse. Celle-ci est effectuée (11) en présence d'un volume de HCl6N pour un volume de bouillon, pendant 24 heures à 100° en ampoules scellées sous vide ; l'hydrolysat est évaporé dans une dessication sous vide, en présence de H_2SO_4 et de KOH en pastilles. On chasse l'acide chlorhydrique en ajoutant un peu d'eau et en évaporant à nouveau : ceci à trois reprises. On reprend l'hydrolysat par un volume d'eau correspondant au volume initial du bouillon.

Le bouillon est soumis avant et après hydrolyse à l'analyse préalable par électrophorèse sur papier puis par chromatcionophorèse; on peut déposer sur le papier des volumes variables suivant l'épaisseur du apier et la densité du bouillon (10 à 50 mm3 dans nos essais.)

1*- Amines pour lesquelles GALE (16) a isolé les décarboxylases responsables de leur formation à partir des acides alfa-aminés correspondants.

Il est indispensable de soumettre le bouillon non ensemencé à une analyse préalable semblable à celle du bouillon ensemencé parce que, en été surtout, pendant la macération et la préparation du bouillon quelques aérobies y poussent et laissent après la stérilisation des traces non négligeables d'amines diverses. Nous avons trouvé dans deux lots de bouillon sur cinq, préparés en été des traces non négligeables de tyramine, putrescine et cadavérine. Il est préférable d'utiliser du bouillon qui ne contient pas d'amines, sinon il faut analyser qualitativement et quantitativement les amines trouvées avant et après l'ensemencement de la bactérie à étudier.

A - ELECTROPHORESE SUR PAPIER

Nous avons utilisé l'appareil de MACHEBOEUF, REBEYROTTE et DUBERT et les grands bacs de LERES*, sous 400 volts, pendant un temps variable suivant la nature du tampon (2 à 6 heures). Ces grands bacs qu'on peut brancher à raison de deux ou plus à la fois sur l'appareil, permettent d'utiliser des feuilles de 40 cm de longueur sur 29 cm de largeur.

Nous avons étudié la séparation des bases aminées dans les tampons suivants :

tampon de pH 2,4 : acide acétique N.

tampon de pH 4 : phtalate acide de potassium 0 1N; 100 ml, NaOH 0,N, 8 ml; eau q.s. pour compléter 200 ml.

tampon de pH 4 : acide sulfosalicylique 0,05 M; on amène à pH 4 par addition de soude.

tampon de pH 8,6 : véronal acide : 1,84g véronal sodique 10,3 g eau q.s. pour compléter à 1000 ml.

tampon de pH 10,0 : ammoniaque 0,065 N (7 ml d'ammoniaque pur 22° dans un litre d'eau).

Seul le tampon de pH 10,0 (ammoniaque 0,065 N) avec du papier Whatman 3, pendant 4 heures, nous a permis de séparer à partir du bouillon quatre amines

---

* Lérès 9 cité Caurobert PARIS XV

fixes : la tyramine, l'histamine, la putrescine, et la cadavérine; les autres tampons n'ont pas donné de résultat satisfaisant.

On dépose les gouttes du bouillon sur une ligne distante de 8 cm du point médian, c'est à dire à 12 cm de l'extrêmité anodique de la feuille. Les amines migrent vers la cathode beaucoup plus loin que les protides et les acides aminés.

Les gouttes à analyser sont déposées avec des micropipettes graduées 5, 10, 15 mm3; on sèche ces gouttes sur le papier avec un séchoir électrique après chaque 5 mm3 pour que le diamètre de ces gouttes ne dépasse pas 5 mm; on installe la feuille sur le chevalet médian de l'appareil tout en laissant ses deux extrêmités tremper suffisamment dans le tampon, puis on l'humecte délicatement et complètement avec ce même tampon à l'aide d'une pipette de 10 ml, en prenant soin particulièrement de laisser le tampon goutte à goutte et loin des tâches séchées du bouillon. On attend que ces tâches soient mouillées par capillarité et on branche l'appareil.

Après découlement du temps voulu, le papier est séché à l'étuve à 100° puis révélé par pulvérisation d'une solution de ninhydrine (tricétohydrindène) à 0,1 p. 100 dans du butanol saturé d'eau, additionné de 1 pour cent d'acide acétique puis remis à l'étuve pendant quelques minutes pour obtenir des colorations violettes, bleues ou gris-violet suivant la nature de l'amine.

A côté du révélateur général des amines primaires et secondaires qui est laninhydrine nous avons utilisé des révélateurs spécifiques tels que :

1°) le réactif de Pauly, formule de DENT (11) qui colore la tache de tyramine sur le papier d'électrophorèse en rouge-orangé et l'histamine en rose foncé; on le prépare de la façon suivante :

- on mélange 5 cm3 d'une solution d'acide sulfamilique à un pour cent dans l'acide chlorhydrique N refroidi à 0° dans la glace avec 0,5 cm3 d'une solution aqueuse de nitrite de sodium à 5% et 40 cm3 d'une solution aqueuse de carbonate

de sodium à 6,5%. On prépare ce mélange juste avant l'usage et on le pulvérise immédiatement sur le papier d'électrophorèse sèché. Les taches colorées apparaissent à l'instant et sont stables pendant longtemps.

2°) le réactif d'EHRLICH, formule de SMITH (17) donne une coloration pourpre avec la tryptamine; c'est une solution à 1% de p-dinéthylaminobenzaldéhyde dans un mélange de 90 cm3 d'acétone et de 10 cm3 d'acide chlorhydrique pur.

On prépare ce réactif et on le pulvérise immédiatement sur le papier d'électrophorèse sèché; la tache pourpre de la tryptamine apparait en deux minutes à la température du laboratoire.

3°) le réactif de SAKAGUCHI, formule de ROCHE (18) donne une coloration rose (fleur de pêcher) avec l'agmatine, on pulvérise successivement sur le papier sèché :

1°) une solution renfermant 0,2 cm^3 NaOH à 40%; 0,2 cm3 de solution alcoolique d' a-naphtol à 1% ; 0,2 cm3 dé solution aqueuse d'urée à 40% et 10 cm3 de n-butanol

2°) une solution de BrONa provenant de la dilution au cinquième de celle obtenue par l'addition de 0,9 cm3 de brome à 100 cm3 de NaOH à 10%

La coloration des taches n'est stable qu'à condition d'employer des solutions finement pulvérisées et d'opérer la dessication rapide et complète à froid, après la pulvérisation de chacun des deux réactifs.

4°) le réactif de CHARGAFF (22) pour la révélation des amines tertiaires qui ne se révèlent pas avec laninhydrine; il donne sur le papier des taches bleu-foncé sur un fond bleu-clair; on révèle avec ce réactif de la façon suivante :

1 - on pulvérise une solution aqueuse d'acide phosphomolybdique à 2% sur le papier.

2 - on lave par immersion dans le butanol pendant 5 minutes

3 - on lave dans l'eau courante pendant 5 minutes.

4 - on plonge après dans une solution de chlorure stanneux à C,4% dans l'acide chlorhydrique 3 N.

Les taches bleu-foncées apparaissent immédiatement sur un fond clair.

La mobilité d'une amine c'est-à dire la distance parcourue par ce corps sur le papier à électrophorèse dépend de la nature de l'amine, de pH du tampon, de la durée de l'électrophorèse; mais il faut noter qu'elle n'est pas la même si cette amine est en solution pure ou en présence d'excès d'autres substances. Nous avons remarqué qu'elle diminue si l'amine est en présence du bouillon (voir figure 1)

Pour rechercher la mobilité des amines dans le bouillon, nous avons utilisé la technique des témoins latéraux; nous avons mis sur le papier à électrophorèse successivement le bouillon pur non ensemencé que ne contient initialement pas d'amines et additionné des différentes amines témoins. Au point n° 7 (fig II) nous avons mis 10 mm3 d'un bouillon ensemencé avec une souche d'Inflabilis lacustris nous avons trouvé ainsi dans ce bouillon un corps qui donne une tache qui correspond à celle de l'histamine.

Pour s'assurer que ce corps est bien l'histamine, il faut faire une nouvelle électrophorèse et la révéler avec le révélateur spécifique de l'histamine qui est le réactif de Pauly; puis faire une troisième électrophorèse avec des témoins internes, c'est-à dire déposer sur le papier au-dessus de la goutte de bouillon l'histamine pur comme témoin interne pour voir s'il migre avec le corps trouvé et si l'ensemble donne une seule tache. On fait encore une autre électrophorèse après l'hydrolyse préalable du bouillon pour éliminer les taches dues aux peptides; enfin il faut éluer ce corps et faire avec cet éluat de nouvelles électrophorèses avec différents tampons ainsi que des chromatographies et des chromatoionophorèses afin de dresser la courbe d'absorption au spectropho-

fig. I.- Electrophorèse 400 volts, durée 5 heures, papier Whatman 3, pH 10,0 révélation ninhydrine acétique.

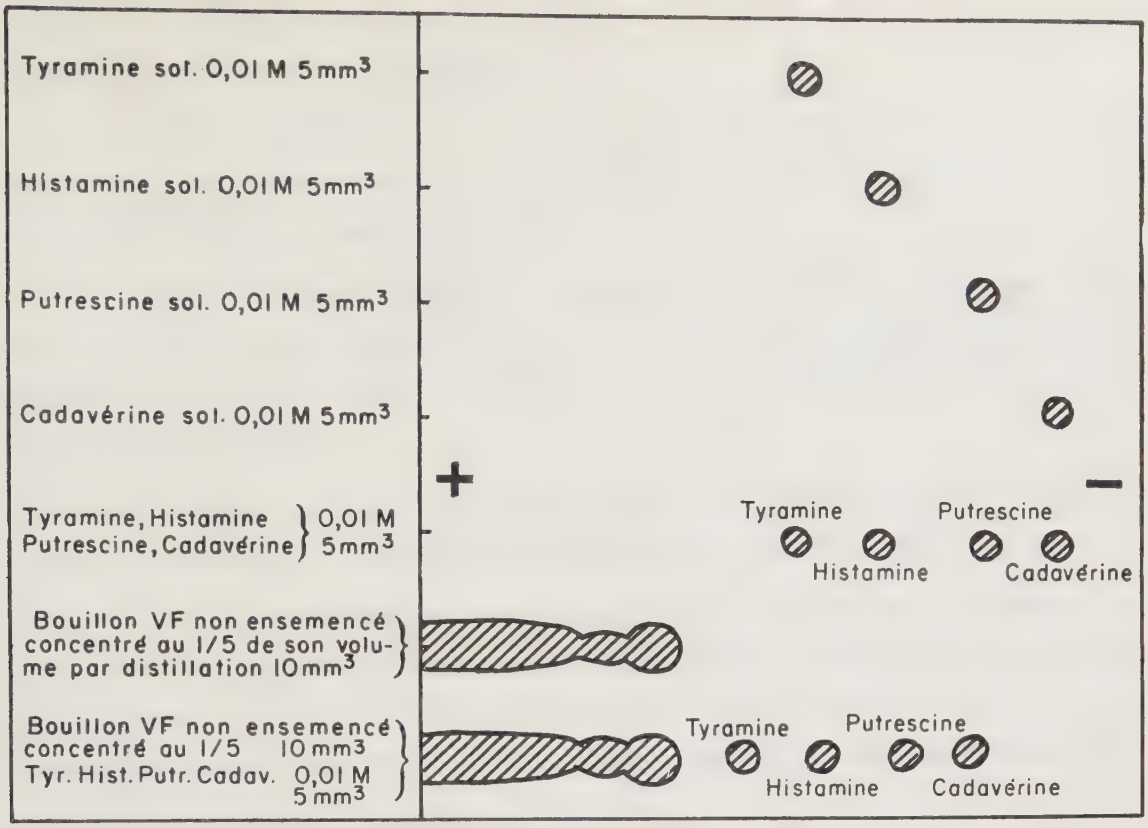
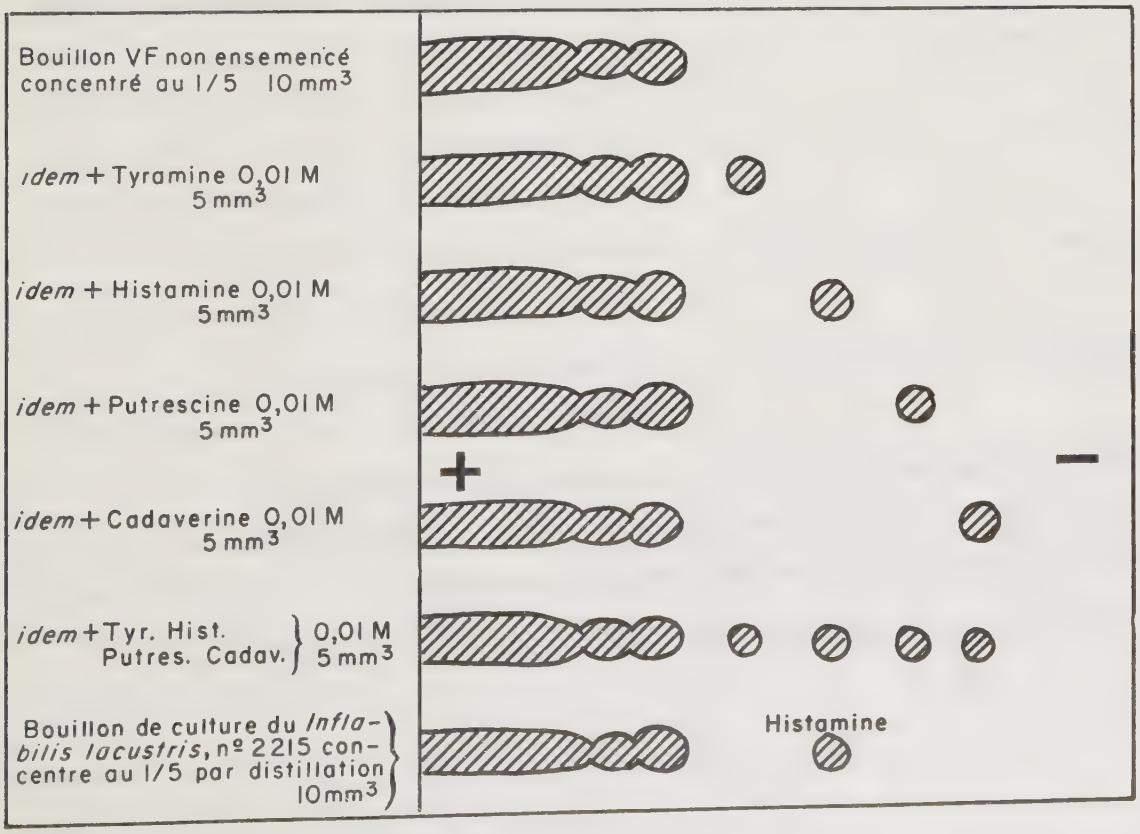


fig. II.- Electrophorèse 400 volts, durée 5 heures, papier Whatman 3, pH 10,0 révélation ninhydrine acétique.



tomètre avec un réactif approprié.

Pour avoir des résultats valables, il faut que chaque expérience d'électrophorèse, de chromatographie ou de chromatophorèse soit accompagnée et contrôl par des témoins internes et latéraux.

Nous donnons ci-après le tableau I qui indique les chemins parcourus en cm, par les bases aminés en solutions aqueuses sous forme de chlorhydrates à partir de la ligne de départ au cours de l'électrophorèse dans divers tampons sur papier Whatman n° 3.

A titre de comparaison nous avons fait figurer dans ce tableau deux amines : glucosamine, éthanolamine et les acides aminés basiques : lysine, arginine.

Nous avons effectué également l'électrophorèse de la neurine $CH_2 = CH - N\ (CH_3)3\ OH$ dans le tampon à pH 4, nous avons révélé les taches de ces deux corps avec le révélateur de Chargaf cité plus haut ; en 1 heure 30, les chemins parcourus étaient 14,6 cm pour la neurine et 13,4 cm pour la choline.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Nous avons étudié la séparation des amines fixes par la chromatographie ascendante et descendante dans le solvant butanol acide acétique, eau 125: 30 : 125, formule de Woïwood (19). On laisse migrer le solvant jusqu'au bord de la feuille, on la sèche à l'étuve à 100°, ensuite on la développe avec la ninhydrine acétique ou avec un révélateur spécifique approprié comme indiqué précédemment pour l'électrophorèse sur papier.

Voici des RF de ces amines en solutions pures sous forme de chlorhydrate sur papier whatman 3 :

Putrescine : 0,12, Cadavérine : 0,15, Histamine : 0,15, Agmatine : 0,18, Tyramine : 0,61, Tryptamine : 0,66.

Pratiquement si on chromatographie un mélange de ces six amines on obtient deux grosses taches, la première est formée par la putrescine, la cadavérine, l'histamine et l'agmatine, et la deuxième par la tyramine et la tryptamine.

Voici les RF de quelques amino-acides déposés sur le même chromatogramme :

T A B L E A U I

	Tampon pH 8,6 Durée 2h30	Tampon pH 4,0 Acide sulfosalylique Durée 2h30	Tampon pH 4,0 Phtalate Durée 2h	Tampon pH 10,0 Durée 4 h
Agmatine	22 ,5	15,4	16,0	15,2
Cadavérine	23,5	17,2	17,6	15,0
Histamine	16,0	16,2	17,1	9,0
Putrescine	24,3	18,7	18,9	12,6
Tryptamine	12,6	11,4	8,9	8,8
Tyramine	14,4	12,3	10,2	6,0
Ethalomanine	20,8	17,9	16,5	18,5
Glucosamine	9,0	12,7	8,5	3,9
Arginine	12,4	11,4	8,3	5,4
Lysine	13,4	12,4	10,2	4,7

Lysine ,	: 0,13
Arginine	: 0,17
Alamine	: 0,32
Tyrosine	: 0,43
Phénylalanine	: 0,58

De ce qui précède on déduit, que la chromatographie seule ne permet pas d'identifier les amines dans un bouillon de culture puisqu'il contient des acides aminés et des peptides qui ont des RF très voisins des RF des amines; elle ne permet pas non plus, en absence d'amino-acides, la résolution complète d'un mélange de bases aminées.

C - CHROMATOIONOPHORESE

Nous utilisons pour la chromatoionophorèse une feuille de papier whatman n° 3 (23) de 57 cm x 46,5 cm. On effectue dans la première dimension une chromatographie descendante et dans la deuxième dimension une électrophorèse sur papier, le sens du courant étant perpendiculaire au sens d'écoulement du solvant.

On dispose la solution à analyser en O (voir figure III) à 7cm de la ligne médiane MN, vers le bord qui sera plongé dans le compartiment anodique et à 11 cm du bord AB. On trace les lignes EF et GH suivant la largeur de l'appareil à électrophorèse qui doit recevoir ces bandes (soit 32 cm de largeur maximum KL dans nos essais.)

Le solvant utilisé pour la chromatographie est le mélange (butanol ac. acétique-eau 125 : 30: 125) phase supérieure, on met la phase inférieure dans un petit Becher pour saturer l'atmosphère du bac de chromatographie.

On laisse migrer le solvant généralement 24 heures jusqu'à ce qu'il commence à s'écouler du papier; on sèche alors le papier dans une étuve à 100° suffisamment pour chasser les dernières traces d'ac. acétique.

La bande CDEF découpée est placée dans l'appareil à électrophorèse en utilisant un des tampons cités plus haut, les tampons pH 8,6 ou 10,8 de préférence et en mouillant le papier comme indiqué dans le chapitre de l'électrophorèse.

La révélation peut être faite avec le révélateur général qui est la ninhydrine et les révélateurs cités plus haut.

Nous donnons ci-dessous (figure IV) le schéma de séparation d'un mélange d'acides aminés et de bases aminées obtenues par la technique décrite plus haut en utilisant pour l'électrophorèse le tampon pH 8,6.

On voit sur le schéma que toutes les bases aminées analysées sont séparées entre elles, elles migrent beaucoup plus vite vers la cathode que les acides aminés basiques, neutre et acides; ces acides aminés que nous avons déposés à côté des amines sur le même électrochromatogramme sont :

leucine, phénylalanine, valine, tyrosine, alanine, glycine, sérine, histidine, lysine, arginine, acides aspartique et glutamique.

fig. III

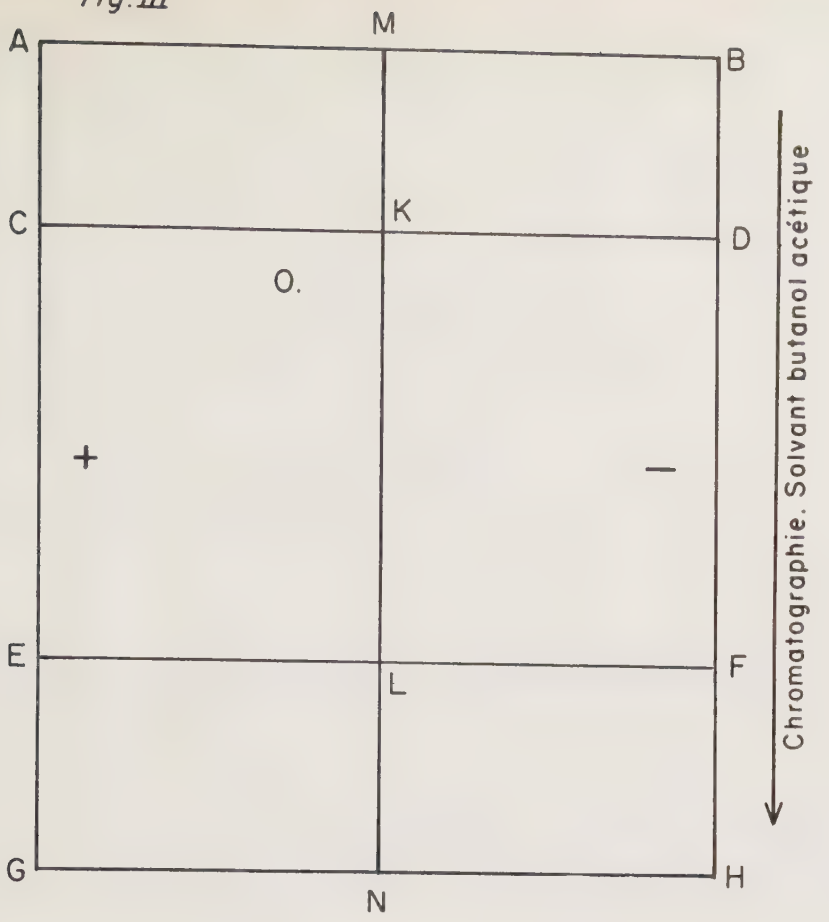
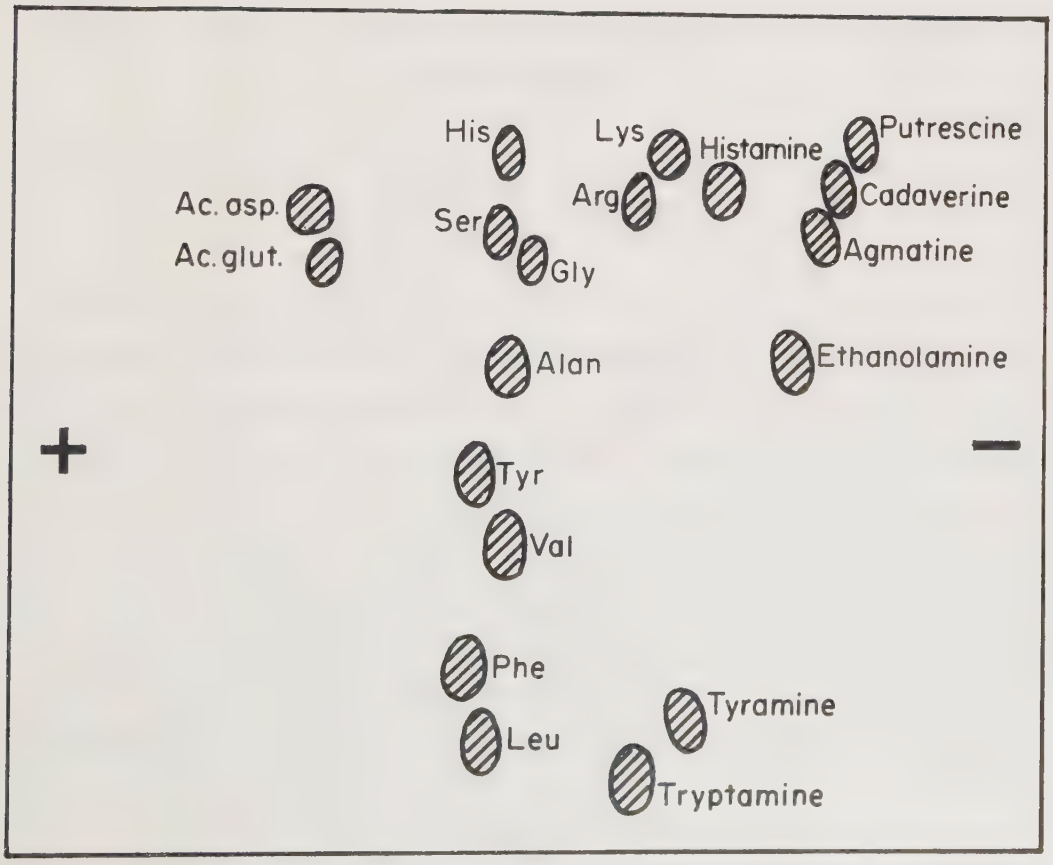


fig. IV -



CHAPITRE IV

AMINES VOLATILES

Les amines volatiles suivantes en solutions aqueuses de leurs chlorhydrates 0,01 M ont été séparées :

Amines primaires : méthylamine, éthylamine, propylamine, butylamine isobutylamine, iscamylamine, phényléthylamine et allylamine.

Amines secondaires: diméthylamine, diéthylamine (en solution 0,1 M) et diisoamylamine.

Amines tertiaires : triméthylamine (en solution 0,2 M) et triéthylamine (en solution 0,02 M)

On dépose sur le papier 5 à 10 mm3 de ces solutions. Le distillat alcalin du bouillon à analyser qui est présumé contenir les amines volatiles est recueilli dans un récipient refroidi à 0° (chapitre II) neutralisé par l'acide sulfurique sans excès, avec la phénolphtaléine comme indicateur, puis évaporé à sec sur un bain-marie; le résidu blanc qui est le sulfate des diverses amines volatiles présentes dans ce distillat est dissout dans 5 ml d'eau distillée; ainsi ces amines volatiles sont assez concentrées pour permettre leur identification par la chromatographie et l'électrophorèse. On décèle ainsi des quantités allant jusqu'à 2 µg. On révèle les amines primaires et secondaires avec une solution de ninhydrine à 0,1 pour cent dans le butanol saturé d'eau additionnée de

1 pour cent d'acide acétique, par le même procédé de révélation cité plus haut pour les amines fixes; mais en chauffant plus longtemps pour révéler les couleurs des amines secondaires, on obtient ainsi des colorations violettes, bleues ou rouges suivant la nature de l'amine.

Les amines tertiaires sont révélées par le réactif de Chargaff (voir chapitre précédent).

A - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

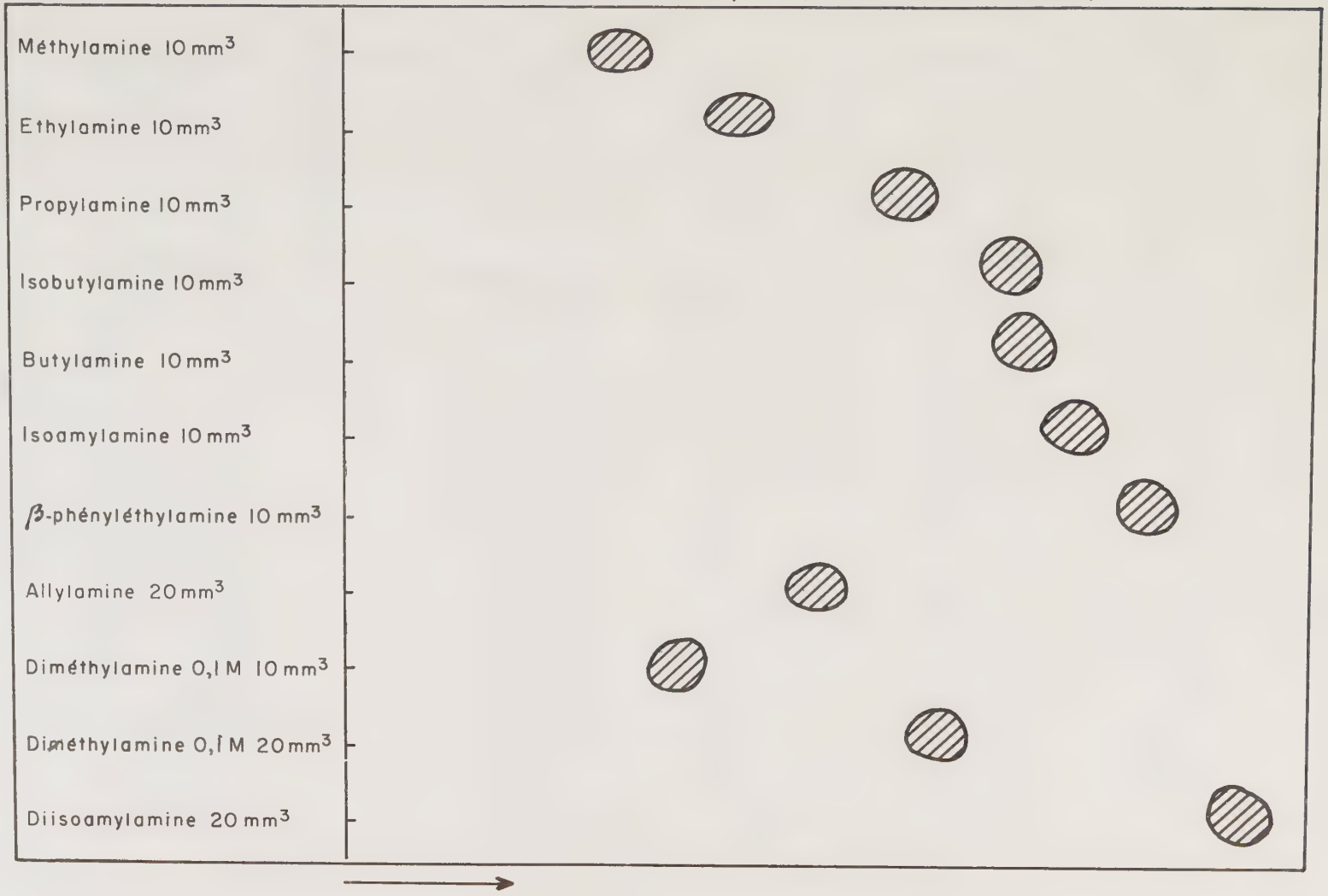
1) Amines primaires et secondaires

On peut séparer et identifier ces amines avec la chromatographie descendante sur le papier w 1 tamponné avec l'acétate de soude à 8,2 g par litre ; avec ce papier tamponné on empêche la formation des taches allongées et difficilement identifiables, on obtient ainsi des taches parfaitement rondes et denses; pour tamponner le papier on le plonge dans la solution tampon et on la sèche immédiatement dans l'étuve à 100°. Le solvant est le mélange butanol - acide acétique - eau 125 : 30 : 125; pour saturer l'atmosphère, on met la phase inférieure (aqueuse) dans un récipient à l'intérieur du bac de chromatographie.

Les solutions des amines obtenues par distillation des milieux de culture comme indiqué plus haut sont déposés sur le papier whatman n° 1 tamponné en quantités variables entre 5 mm3 et 20 mm3, on ne doit pas déposer sur le papier plus de 5 mm3 à la fois pour ne pas avoir des taches d'un diamètre dépassant 0,5 cm les dépôts supérieurs forment sur le chromatogramme des taches trop diffuses ; il est préférable qu'on sèche le papier avec un séchoir électrique après chaque application de 5 mm3.

On arrête la chromatographie quand le solvant migre jusqu'au bord inférieur du chromatogramme, le papier est ensuite séché.

fig. V.- Chromatographie descendante, durée 16 heures, papier Whatman 1 tamponné à l'acétate de soude 8,2‰, révélation ninhydrine acétique. Solution = 0,01 M (sauf indication contraire)



à l'étuve à 100° puis pulvérisé avec la ninhydrine acétique indiquée plus haut et remis à l'étuve de nouveau cinq à quinze minutes pour développer les couleurs.

On trouve dans le tableau II ci-dessous les RF des diverses amines étudiées avec la limite de sensibilité de la réaction à la ninhydrine ainsi que la teinte de la coloration obtenue.

On voit sur la fig. V et le tableau II que les trois groupes d'amines suivantes ont des RF rapprochés et ne se séparent pas bien lorsqu'elles se trouvent mélangées : méthylamine et diméthylamine, butylamine et isobutylamine; propylamine et diéthylamine.

On peut séparer ces amines entre elles en utilisant une bande de papier de 80 cm (papier au mètre) tamponné avec l'acétate de soude comme indiqué ci-dessus et en laissant la chromatographie se poursuivre pendant 40 à 72 heures : chromatographie descendante à écoulement libre.

Ci-dessous deux schémas : Fig VI, une séparation incomplète de méthylamine, diméthylamine et éthylamine par une chromatographie descendante de 24 heures et Fig VII, une séparation parfaite de ces trois amines par une chromatographie descendante continue de 72 heures.

2 - Amines tertiaires

Les triméthylamine et triéthylamine chromatographiées dans les mêmes conditions que les amines primaires et secondaires sur whatman n° 1 tamponné avec le solvant butanol - acétique mais révélés avec la révélation de Chargaff (22) puisqu'ils ne se révèlent pas avec la ninhydrine, ont les RF suivants :

Triméthylamine 0,21 triéthylamine 0,68

T A B L E A U I I

	R F	Révélation à la Ninhydrine Limite de sensibilité en ug	Coloration avec la Ninhydarine
Méthylamine	0,40	0,15	rouge - violette
Ethylamine	0,55	0,10	"
Propylamine	0,64	0,15	"
Isobutylamine	0,76	0,2	"
Butylamine	0,79	0,35	"
Isoamylamine	0,86	0,10	"
Allylamine	0,61	0,6	"
B- phényléthylamine	0,84	0,5	bleue
Diméthylamine	0,45	0,2	rosée
Diéthylamine	0,66	18	"
Diisoamylamine	0,95	30	"

A côté nous avons chromatographié deux corps révélables par le réactif de Chargaff, la choline et son amine de déshydratation la neurine ; leurs RF sont :

choline : 0,35

neurine : 0,41

Ci-dessous le schéma de séparation de ces quatre corps; figure VIII.

B - ELECTROPHORESE SUR PAPIER

1 - Amines primaires et secondaires

L'électrophorèse est pratiquée comme pour les amines fixes sur papier whatman n° 1 et révélée par la ninhydrine-acétique, ci-dessous le tableau III qui indique en centimètre les distances parcourues par ces amines dans le tampon à pH 4 pendant 1 heure30

2 - Amines tertiaires

Le tableau IV indique les distances parcourues en cm par la triméthylamine et la triéthylamine avec la choline et la neurine dans le tampon de pH 4 à base de phtalate sur papier Whatman n° 1, ainsi que la limite de sensibilité avec le révélateur de Chargaff, l'électrophorèse a été poursuivie pendant 1 heure 30.

fig. VI.- Chromatographie descendante, durée 24 heures, papier Whatman 1 tamponné, révélation ninhydrine acétique.

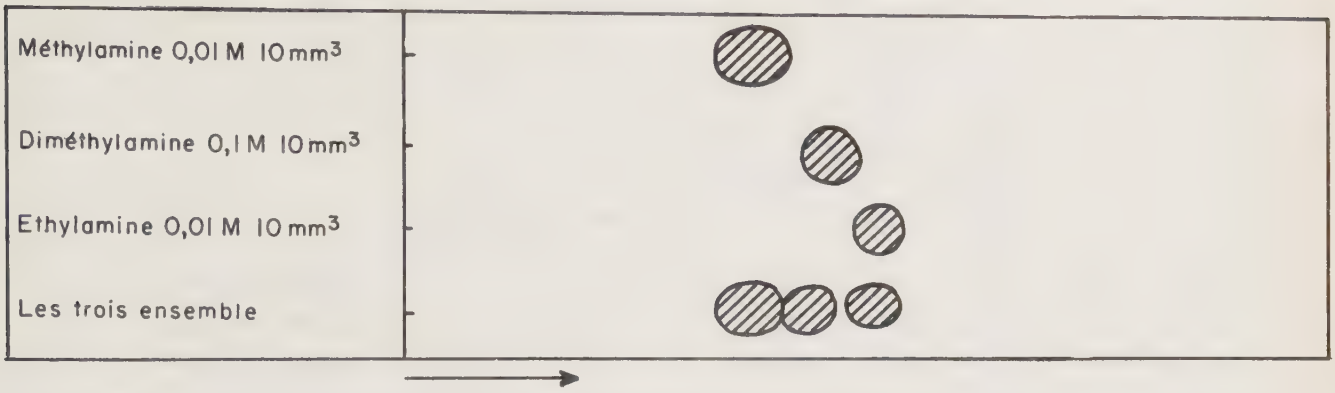


fig. VII.- Chromatographie descendante continue, durée 72 heures, papier Whatman 1. tamponné, révélation ninhydrine acétique.

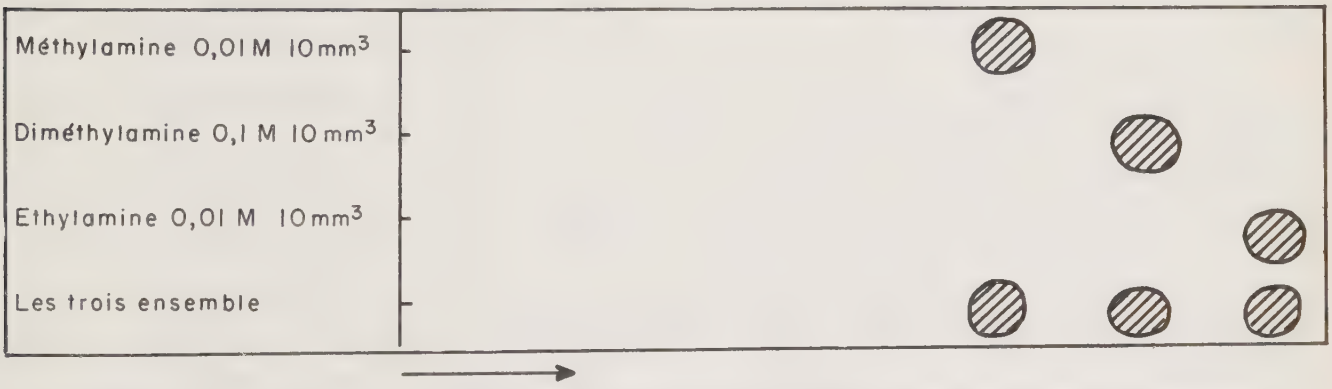
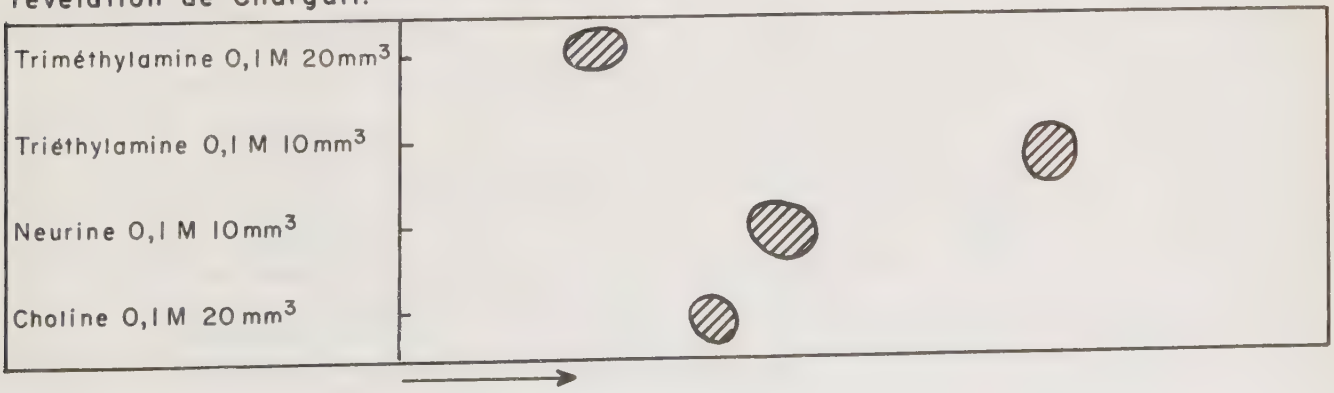


fig. VIII.- Chromatographie descendante, durée 16 heures, papier Whatman 1 tamponné, révélation de Chargaff.



T A B L E A U I I I

	Chemins parcourus en centimètres
Méthylamine	19,5
Ethylamine	14,5
Propylamine	12,4
Butylamine	11,2
Isobutylamine	11,2
Isoamylamine	10,2
Allylamine	13,0
B - phényléthylamine	8,5
Diméthylamine	15,5
Diéthylamine	11,6
Diisoamylamine	7

T A B L E A U I V

	Chemin parcouru en cm	Révélateur de Chargaff Limite de sensibilité en µ
Triméthylamine	16	60
Triéthylamine	11,7	9
Neurine	14,6	2,5
Choline	13,4	10

Les taches obtenues par électrophorèse sont moins étalées que celles obtenues par chromatographie, ce qui augmente la sensibilité de la révélation.

CHAPITRE V

DOSAGE DES AMINES

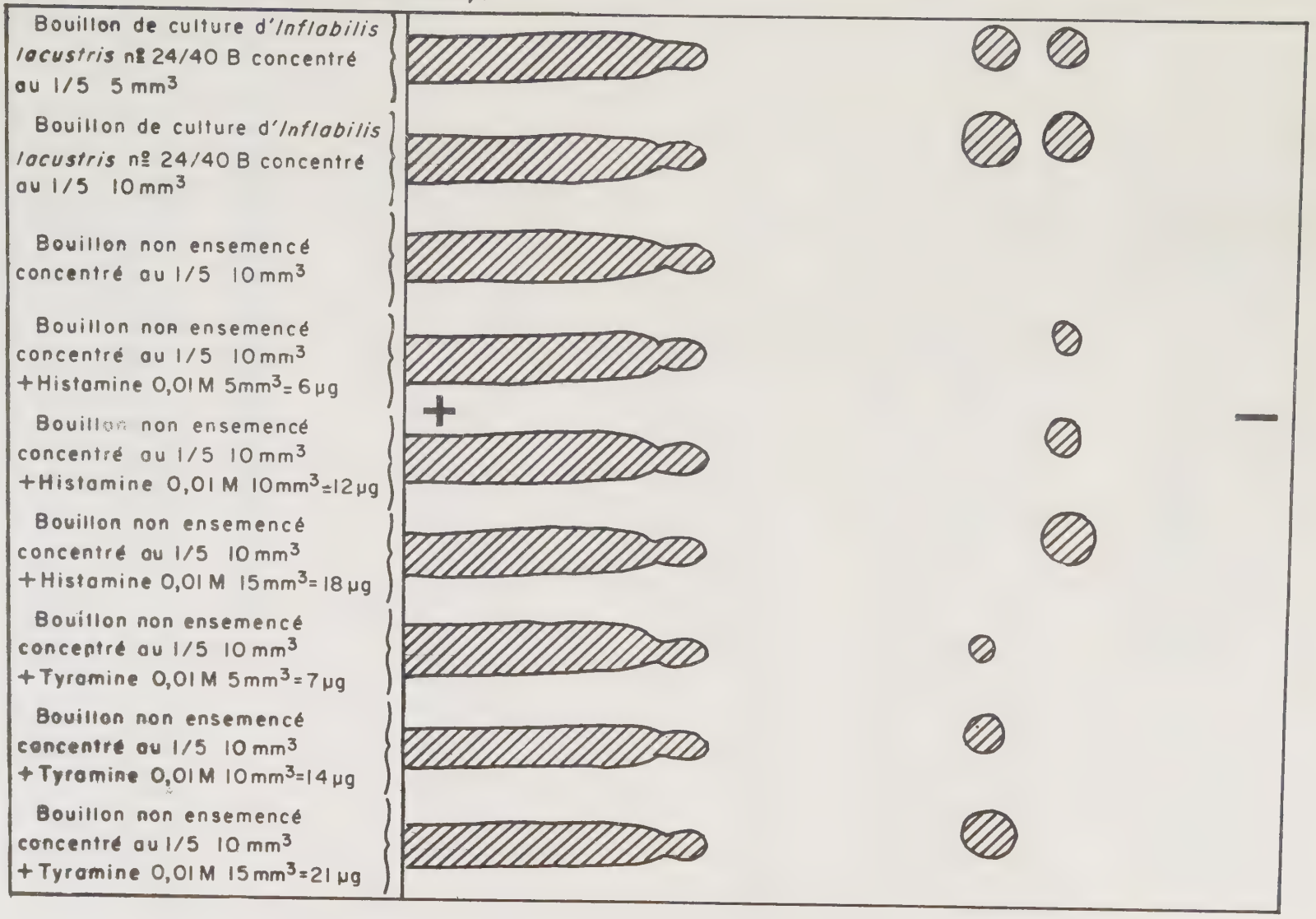
Divers procédés peuvent être appliqués pour l'évalutaion quantitative des amines dans le bouillon de culture.

I - EVALUATION DIRECTE

Elle consiste à comparer visuellement l'intensité et l'ordre de grandeur des taches obtenues par électrophorèse et chromatographie avec des quantités croissantes de témoins. Ci-dessous Fif IX, un exemple d'une souche d'Inflabilis lacustris n° 24/40B qui produit dans le bouillon de culture de l'histamine et de la tyramine; puisque les solutions pures d'amines migrent plus loin que les amines accompagnées des protéines du bouillon de culture, on ajoute sur la feuille d'électrophorèse aux gouttes des solutions d'amines témoins, un bouillon non ensemencé qui ne doit contenir aucune trace d'amines.

Avec cette méthode, on peut déterminer des quantités d'amines allant jusqu'à $\pm$ 2μ g ce qui donne une évaluation finale dans un litre de bouillon de $\pm$ 20% dans des conditions moyennes.

fig. IX – Electrophorèse 400 volts, durée 5 heures, tampon pH 10,0, papier Whatman 3, révélation par le réactif de Pauly.



Voici un schéma fig X d'une chromatographie d'amines volatiles trouvées dans le distillat du bouillon de culture d'une souche d'Inflabilis lacustris n° 08/7B qui produit la méthylamine, l'éthylamine, l'isoamylamine et la β- phényl thylamine; nous avons placé à côté des quantités croissantes appropriées de témoins purs.

Ces amines se trouvent dans le bouillon de culture en quantités très inégales de sorte que quand nous n'avons déposé que 10 m3 du distillat concentré au $\frac{1}{200ème}$ de son volume, nous avons trouvé la méthylamine, et la β -phényléthylamine et en déposant 40-50 et 60 mm3, nous avons trouvé en plus l'éthylamine et l'isoamyline.

En effet, dans un litre de bouillon de culture de cette souche, il y avait 1,10 milligramme de méthylamine,

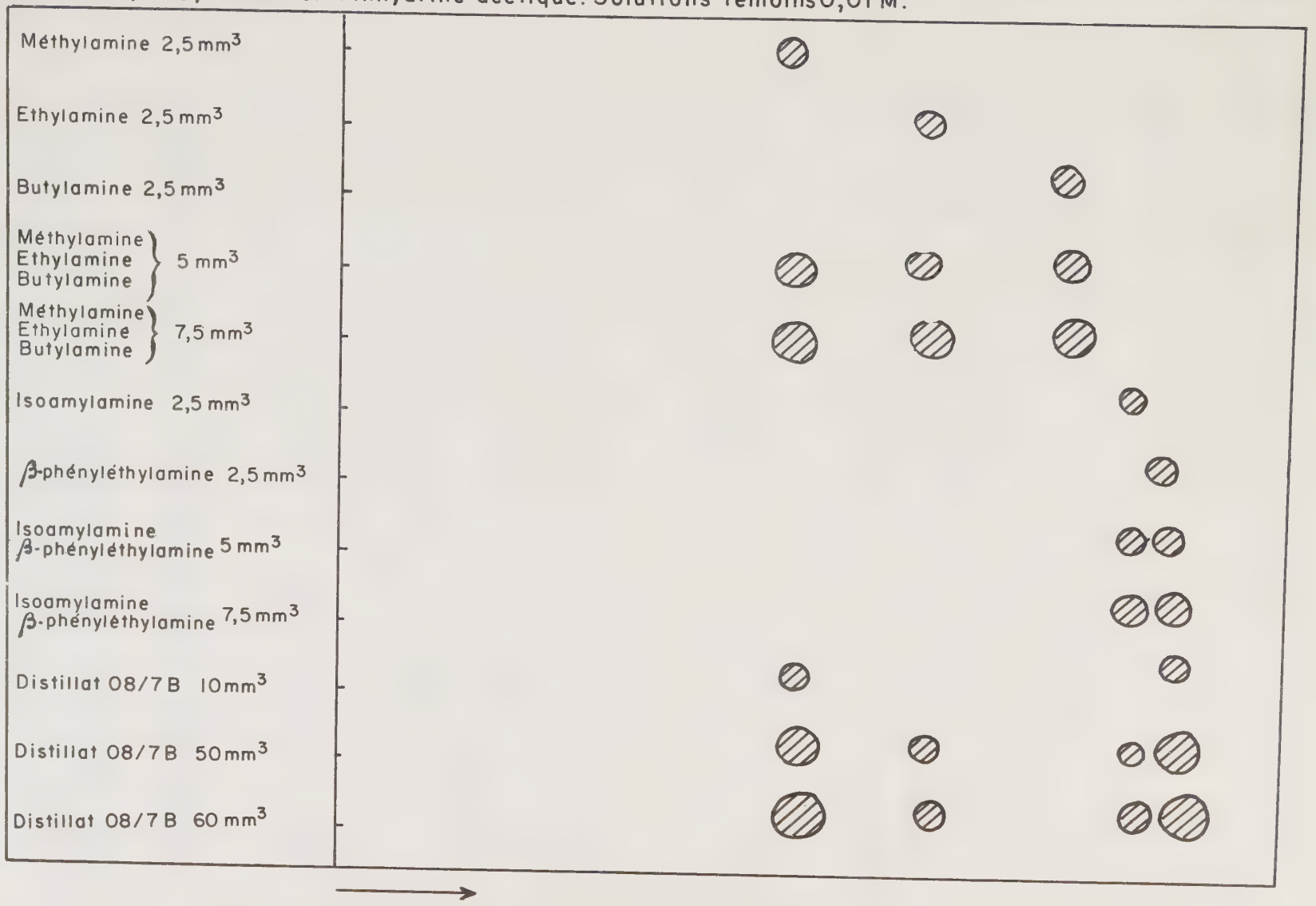
2,25 mg du β - phényléthylamine
0,10 mg de l'éthylamine et
0,21 mg de l'isoamylamine.

En faisant varier les quantités déposées du distillat et des solutions témoins, on peut arriver à avoir des taches de la même intensité et du même ordre de grandeur jusque $\pm$ 1 ug et on calcule la quantité d'amine dans un litre du bouillon avec une précision de $\pm$ 20%.

II - DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE APRES ELUTION

On fait éluer la partie du papier d'électrophorèse ou de chromatographie présumée contenir l'amine. Sur cet éluat, on fait agir un réactif approprié et on mesure sa densité optique au spectrophotomètre; parallèlement on prépare une courbe de concentration de cette même amine rigoureusement dans les mêmes conditions et en reportant

fig. X – Chromatographie descendante, durée 16 heures, papier Whatman nº 1 tamponné avec l'acétate de soude 8,2 ‰, révélation ninhydrine acétique. Solutions témoins 0,01 M.



la densité optique de l'échantillon étudié sur cette courbe, on a quantitativement cette amine dans l'échantillon, on calcule la quantité dans un litre de bouillon.

Elution

On fait une électrophorèse ou une chromatographie après avoir déposé plusieurs gouttes l'une à côté de l'autre de la solution étudiée, c'est-à dire du bouillon ou du distillat puis on révèle deux bandes étroites aux deux extrêmités, supérieure et inférieure de ce papier pour localiser l'emplacement de l'amine ou des amines qu'on veut doser ensuite on découpe la bande de papier qui contient ces amines comme indiqué sur le schéma suivant fig XI.

Ces bandes découpées peuvent être éluées par immersion dans l'eau distillée avec agitation mécanique ou mieux, on élue par capillarité en opérant de la manière suivante :

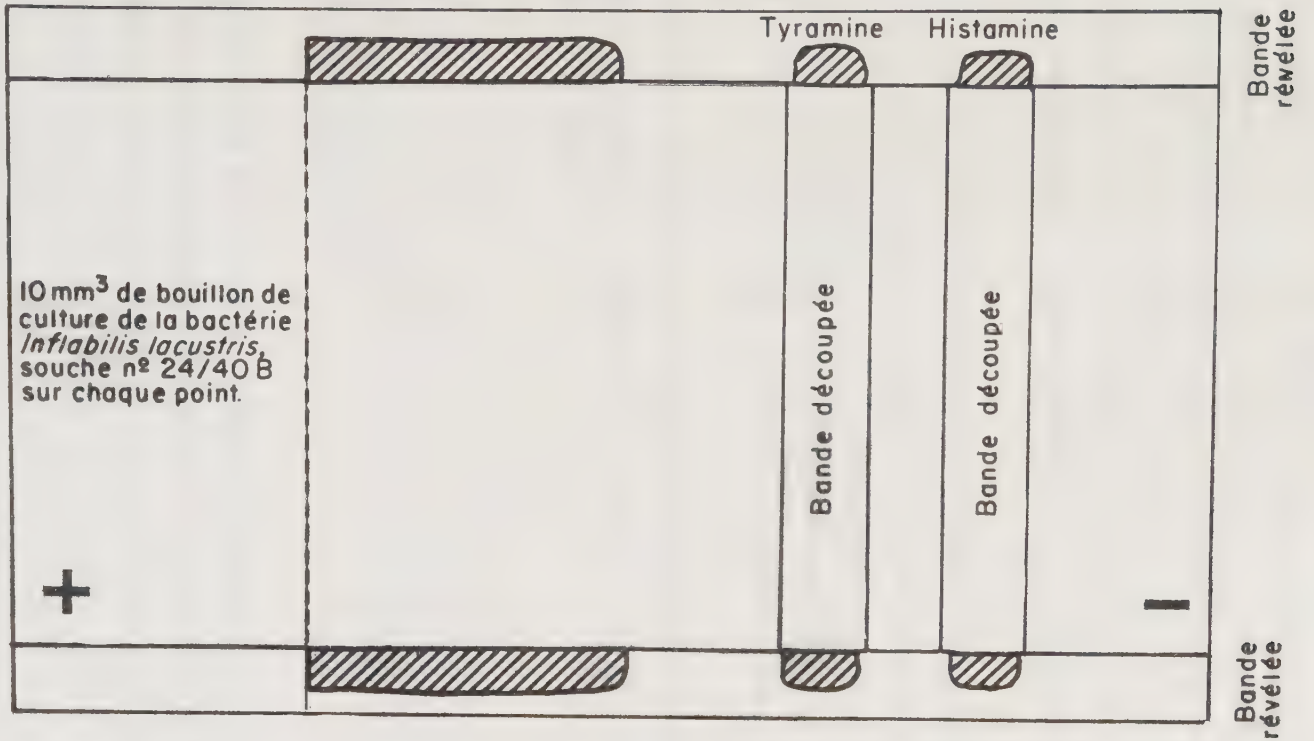
Dans un vase clos de chromatographie, on plonge dans l'eau distillée l'extrêmité supérieure de cette bande découpée et on recueille de l'extrêmité inférieure, l'eau qui tombe goutte à goutte par capillarité; on laisse l'opération continuer pendant 1-4 jours et avant de l'arrêter on s'assure que l'eau qui coule, ne contient plus d'amines, avec le réactif de Pauly pour l'histamine et la tyramine, ou la ninhydrine pour les autres amines.

On peut doser la base aminée qui se trouve dans cet éluat par différents procédés :

1°) Dosage de l'histamine et de la tyramine par le réactif de Pauly

C'est la méthode citée par Frankel, Courat et Singer (24) pour l'histidine et la tyrosine. La solution à analyser est diluée à 2 ml traitée par 0,2 ml de l'acide sulfanilique à 1% dans

fig. XI.- Electrophorèse 400 volts, tampon pH 10,0, durée 6 heures, papier Whatman nº 3, révélation par le réactif de Pauly.



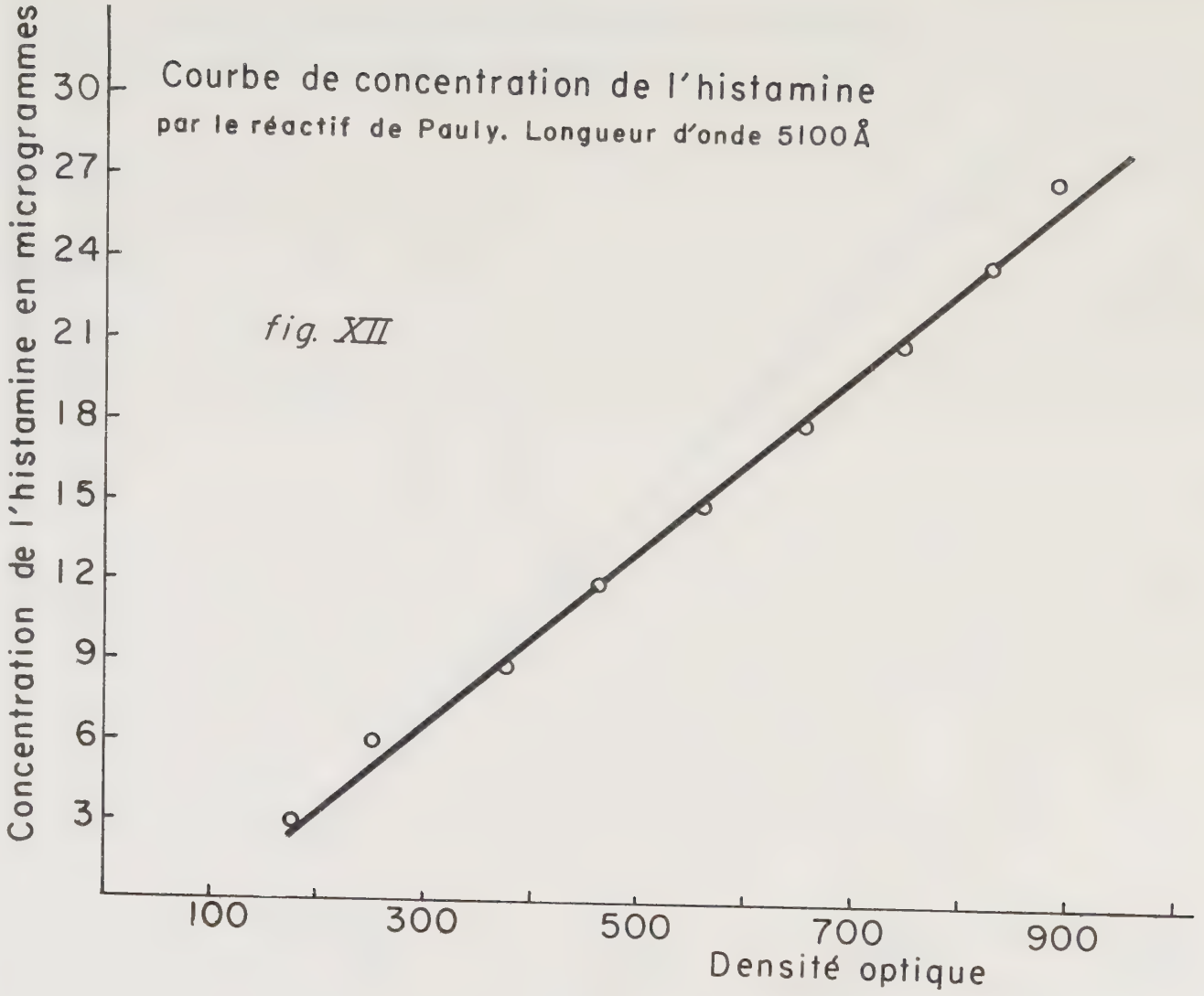
l'acide chlorhydrique N et par 0,2 ml du nitrite de sodium à 5%; après 30 minutes à la température du laboratoire, on ajoute 5 ml d'une solution de carbonate de soude, 6,5% pour le dosage de l'histamine et 2,5 ml de cette même solution pour celui de la tyramine; la lecture est faite au spectrophotomètre à 5 100 Å après 5 minutes. Parallèlement, on prépare avec des quantités de 2 à 30 de ces deux amines, une courbe de concentration (qui est droite) en diluant ces quantités dans 2 ml d'eau distillée et avec les mêmes réactifs dans les mêmes conditions.

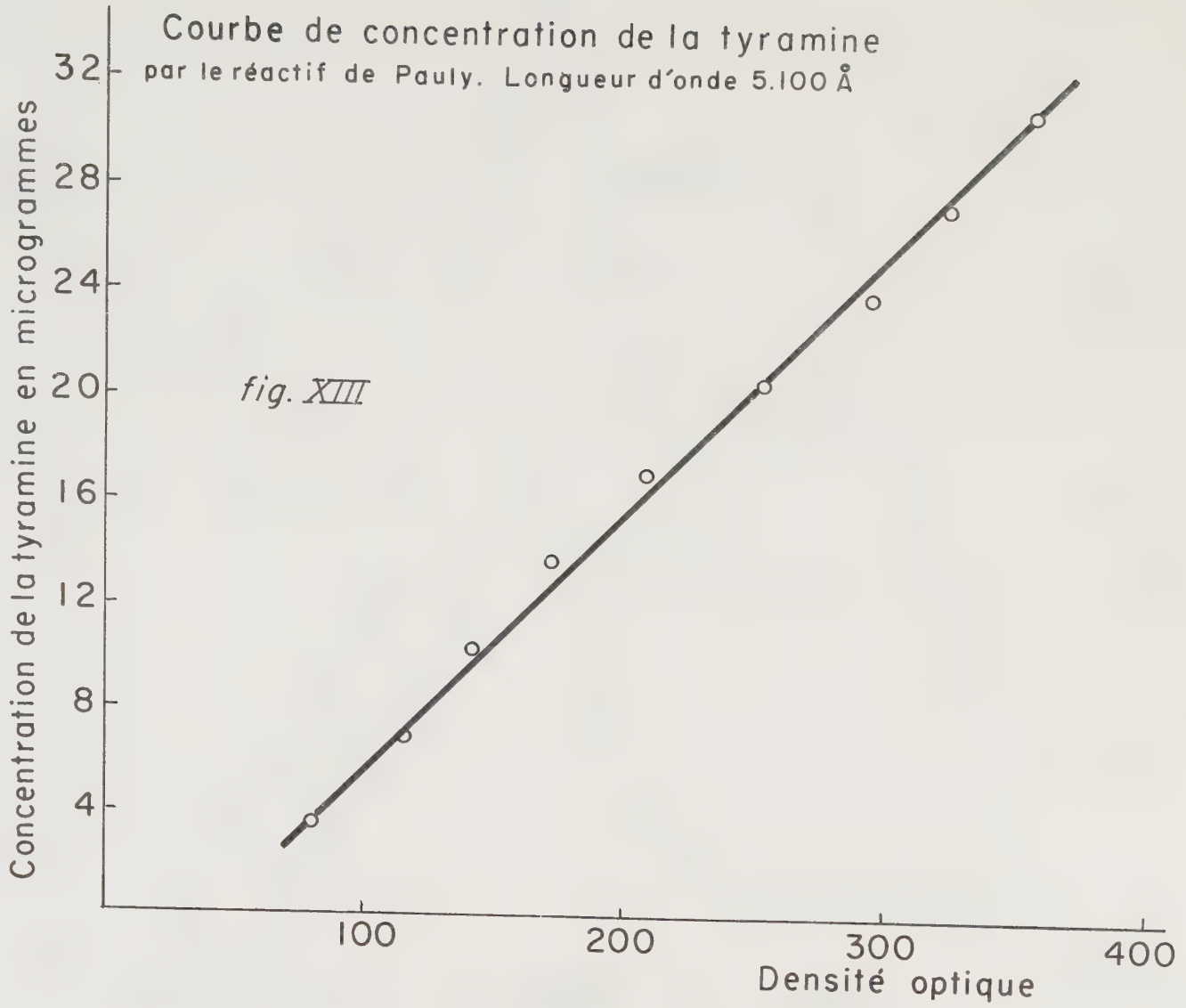
Cette courbe de concentration est effectuée en mettant en abcisses la densité optique indiquée par le spectrophotomètre et en ordonnée la concentration de l'amine dosée en μg, on reporte sur cette courbe la densité optique de l'échantillon dosé qui doit contenir de 2 à 15 μg et on lit directement sa concentration.

Il convient de faire cette courbe de concentration avec chaque série de dosage en utilisant les mêmes lots de réactifs et d'eau distillée.

La précision est de $\pm$ 1 μg, ce qui donne dans un litre de bouillon de culture microbienne une précision finale de $\pm$ 5%. Ci-dessous une courbe de concentration d'histamire fig. XII et de tyramine Fig XIII.

On peut aussi se servir de cette même réaction pour l'identification spectrophotométrique finale de l'histamine et de la tyramine, après leur identification par chromatographie et électrophorèse en traçant leurs courbes d'absorption, c'est-à dire, la variation de leur densité optique avec la longueur d'onde du faisceau lumineux qui les traverse. On s'aperçoit dans la Fig XIV que l'histamine a un double pic caractéristique à 3.800 Å. Pour obtenir ces courbes d'absorption, il faut faire la soustraction de la densité optique du réactif seul qui est


Courbe de concentration de l'histamine
par le réactif de Pauly. Longueur d'onde 5100 Å
fig. XII
Concentration de l'histamine en microgrammes
30
27
24
21
18
15
12
9
6
3
100
300
500
700
900
Densité optique


Courbe de concentration de la tyramine
par le réactif de Pauly. Longueur d'onde 5.100 Å
fig. XIII
Concentration de la tyramine en microgrammes
32
28
24
20
16
12
8
4
100
200
300
400
Densité optique

Courbes d'absorption de l'histamine et de la tyramine

Réactif de Pauly

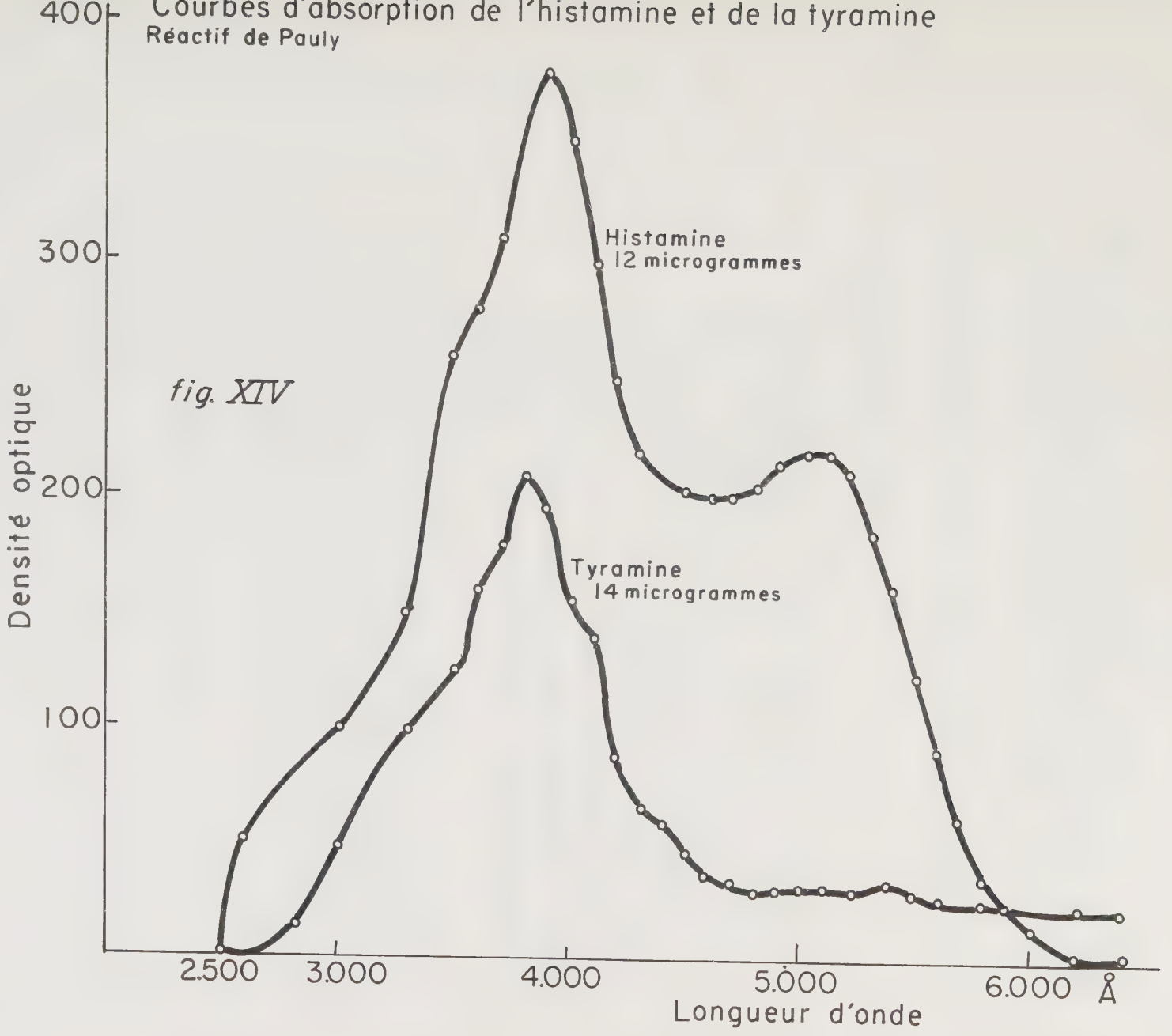


fig. XIV

très légèrement coloré des densités optiques des solutions contenant l'histamine et la tyramine.

2°) Dosage des amines par la ninhydrine - hydrindantine. Méthode de Moore et Stein (25) pour la détermination photométrique des acides aminés et leurs dérivés.

La solution du réactif est préparée avec les produits suivants

1 - Ninhydrine : pure

2 - Hydrindantine : on mélange en agitant une solution de 8 grammes de ninhydrine dissouts dans 200 ml d'eau distillée à 90° avec une solution de 8 grammes d'acide ascorbique dissouts dans 40 ml d'eau à 40°; la cristallisation de l'hydrindantine commence immédiatement sans chauffage supplémentaire, une demi-heure plus tard, le produit obtenu est filtré et lavé avec l'eau, séché jusqu'au poids constant dans un dessicateur sous vide, protégé de la lumière, sur SO_4H_2 et KOH en pastilles, puis conservé dans une bouteille opaque.

3 - Tampon pH = 5,5 : Acétate de soude 4 N : on dissout 272 grammes d'acétate de soude dans 200 ml d'eau distillée en chauffant sur un bain-marie; après refroidissement on ajoute 50 ml d'acide acétique glacial, et on complète jusqu'à 500 ml, la solution doit avoir un pH = 5,5.

4 - Méthylcellosolve : redistillé pur.

Solution du réactif préparée extemporairement en dissolvant 0,1 gr. de ninhydrine et 0,02 gramme d'hydrindantine dans 8,5 ml de méthylcellosolve et 3 ml de tampon pH = 5,5; la solution rougeâtre obtenue est faite dans une bouteille opaque et utilisée tout de suite.

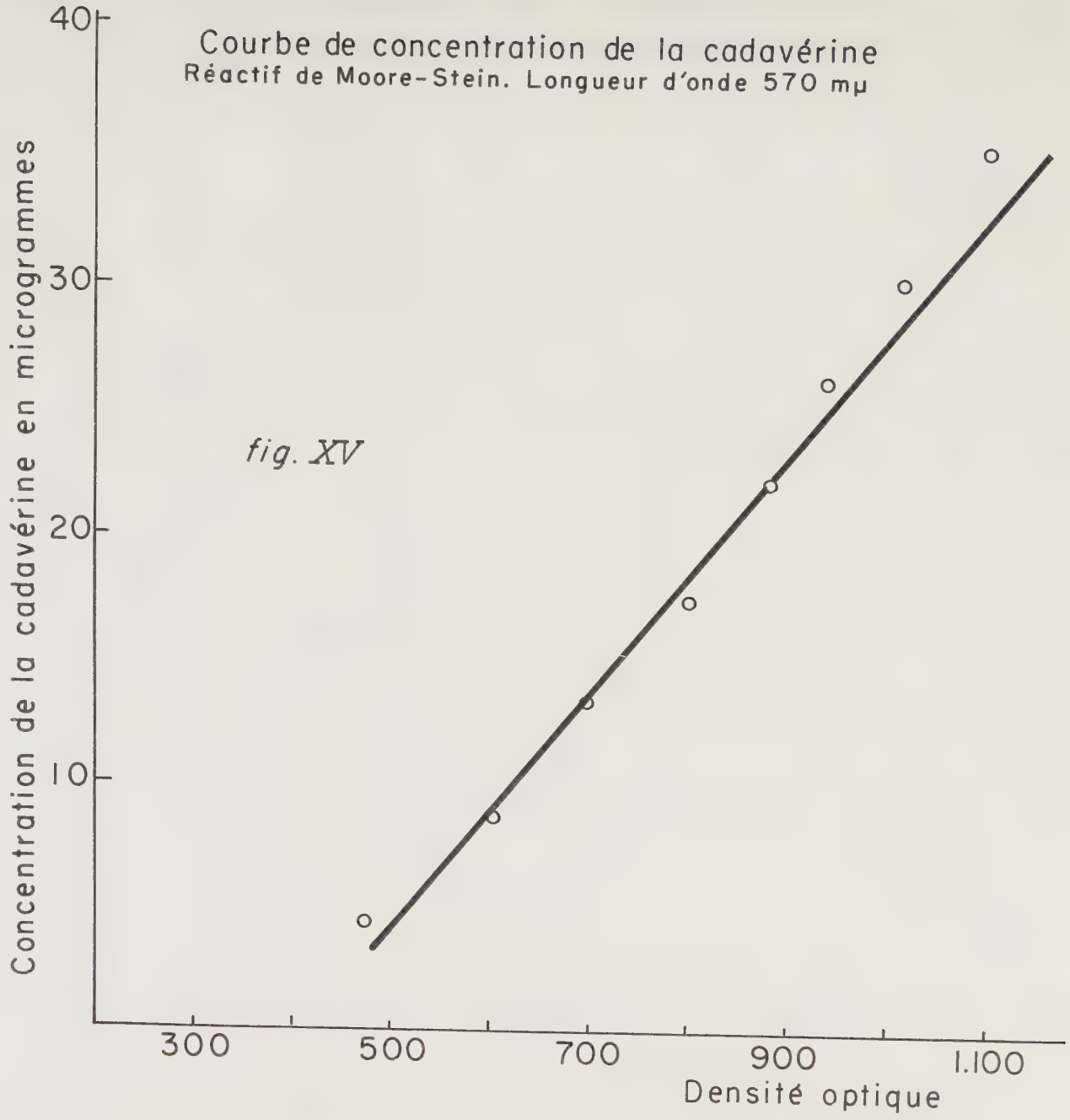
Mode opératoire

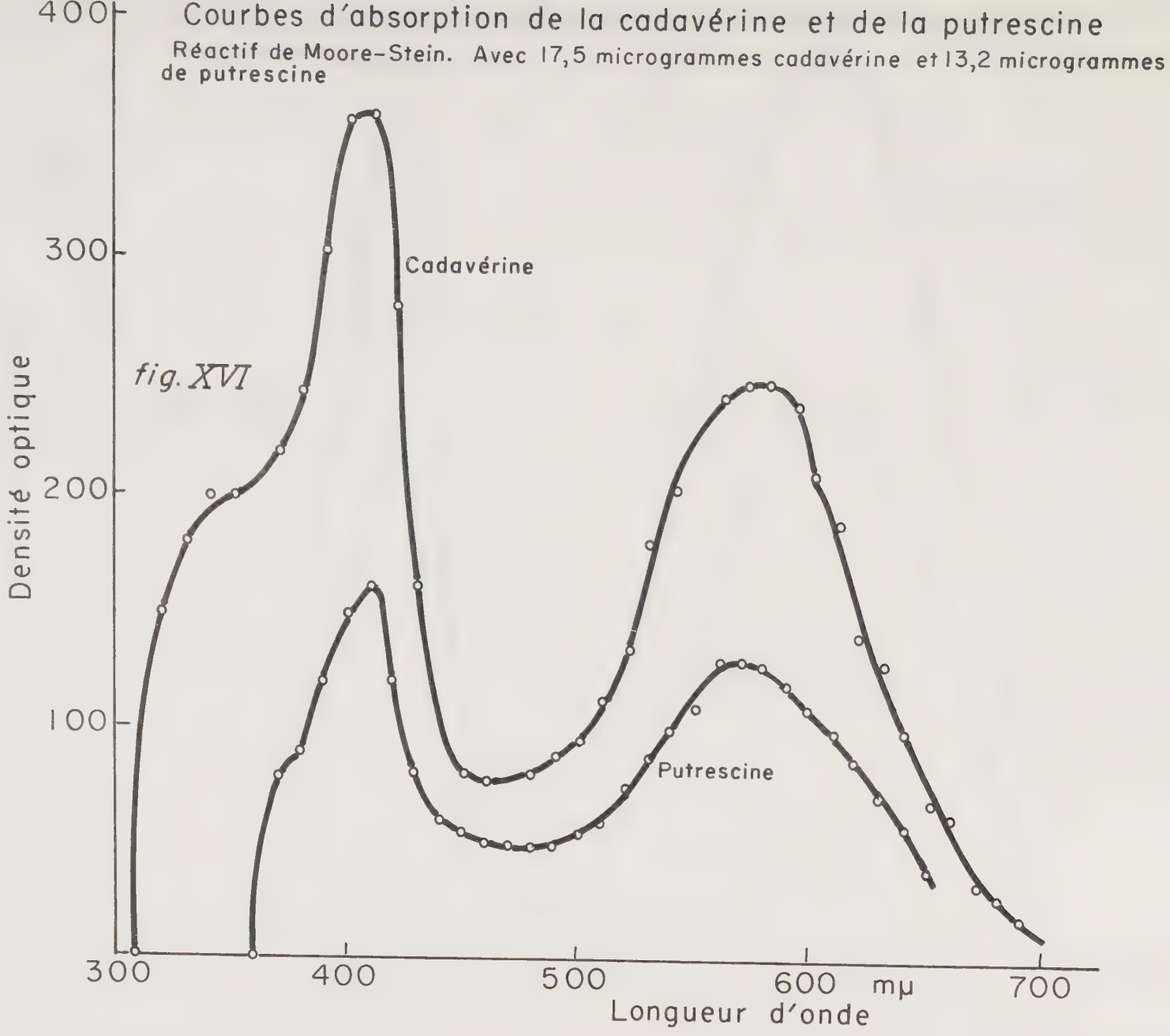
La solution à analyser qui doit contenir de 5 à 15 microgrammes d'une amine qui donne une coloration avec la ninhydrine est diluée à 2 ml, puis traitée par 1 ml de la solution du réactif; le tube est bouché capuchonné, agité brièvement et chauffé dans un bain-marie bouillant couvert pendant 15 minutes; après refroidissement rapide dans l'eau froide, la lecture est faite au spectrophotomètre sans ou après dilution avec une solution d'alcool éthylique - eau distillée 50% suivant l'intensité de la coloration obtenue, la lecture est faite à 5.700 $\mathring{A}$ = 570μ g.

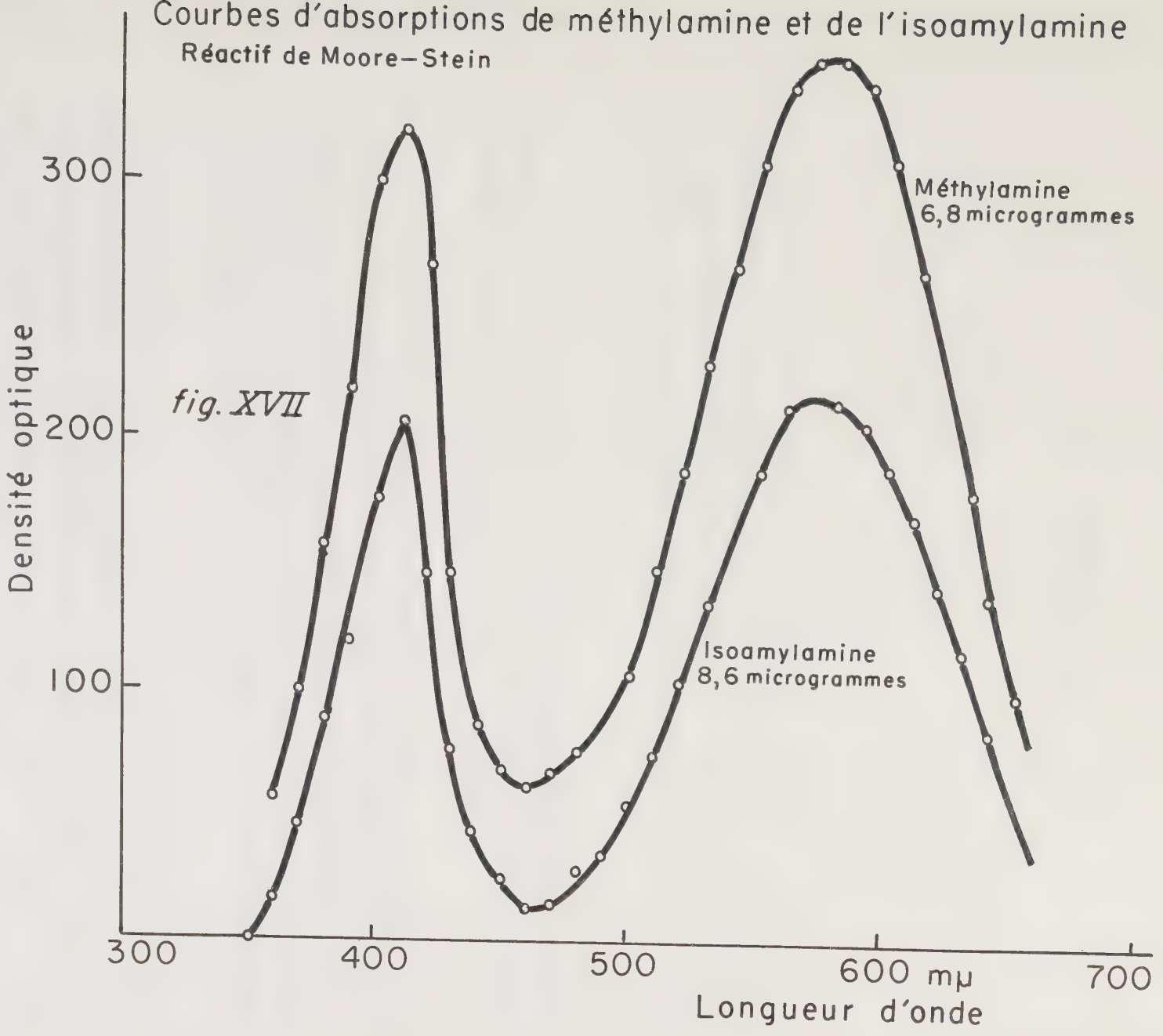
Comme dans le dosage avec le réactif de Pauly, on fait une courbe de concentration avec des quantités croissantes régulièrement d'amines de 5 à 30 microgrammes en portant en abscisses la densité optique et en ordonnée la concentration en microgrammes.

Les dosages avec cette méthode n'ont de valeur que si on fait simultanément et rigoureusement dans les mêmes conditions, une courbe de concentration avec chaque série de détermination, puisque des traces infines d'ammoniaque ou de ses composés dans l'atmosphère ou dans l'eau changent considérablement la coloration obtenue. Ci-dessous, Fig XV, la courbe de concentration de la cadavérine préparée avec des volumes de 0,25 - 2 ml d'une solution 0,0001 M, c'est-à dire de 4,4 - 35 microgrammes de cadavérine ; la précision est du même ordre qu'avec le réactif de Pauly : $\pm$ 5%.

La putrescine, la cadavérine, la méthylamine, l'éthylamine, la butylamine, l'isoamylamine et la β - phényléthylamine ont toutes deux pics à 410 et 570 my comme le montrent les figures XVI et XVII.


Courbe de concentration de la cadavérine
Réactif de Moore-Stein. Longueur d'onde 570 mμ
fig. XV
Concentration de la cadavérine en microgrammes
40
30
20
10
300
500
700
900
1.100
Densité optique


Courbes d'absorption de la cadavérine et de la putrescine
Réactif de Moore-Stein. Avec 17,5 microgrammes cadavérine et 13,2 microgrammes de putrescine
fig. XVI
Cadavérine
Putrescine
Densité optique
400
300
200
100
300
400
500
600 mμ
700
Longueur d'onde


Courbes d'absorptions de méthylamine et de l'isoamylamine
Réactif de Moore–Stein
fig. XVII
Densité optique
300
200
100
Méthylamine
6,8 microgrammes
Isoamylamine
8,6 microgrammes
300
400
500
600 mμ
700
Longueur d'onde

CHAPITRE VI

RESULTATS

Dans le tableau suivant figurent les amines trouvées dans les cultures de quinze souches d'Inflabilis lacustris en bouillon VF glucosé, âgé d'une semaine; les quantités sont exprimées en milligrammes par litre de bouillon, ces quantités sont souvent variables suivant l'âge, le lot du milieu de culture et surtout la virulence de cette bactérie.

A côté, figure le pouvoir pathogène moyen pour chaque souche exprimé en jours de survie après l'inoculation par voie parentérale de 5 ml du bouillon de culture ; les animaux étaient gardés 15 jours en observation.

On constate que la toxicité des différentes souches est proportionnelle au pouvoir de décarboxylation et à la formation des amines toxiques, avec 5 ml intrapéritonéal de bouillon de culture âgé de deux jours, la mortalité est de l'ordre de 60% parmi les animaux qui ont reçu les souches qui forment des amines fixes toxiques, et de l'ordre de 20% parmi les animaux qui ont reçu les souches qui forment des amines volatiles moins toxiques.

Ce pouvoir pathogène est très atténué dans les bouillons de culture vieillis de deux mois, dans lesquels les bactéries étaient mortes, la proportion de mortalité descend ici de 60% pour atteindre 20% pour les souches à amines fixes et à 10% pour les souches à amines volatiles, comme si l'action nocive de cette anaérobie est liée à sa vie et à la formation des amines toxiques à l'intérieur de l'organisme. En faveur de cette théorie, on peut alléguer le fait que parmi

les cobayes qui ont reçu en solutions pures les mêmes quantités d'amines que dans ces bouillons de culture, la proportion de mortalité est de l'ordre de zéro sur dix, ce qui montre que ce n'est pas la toxicité de ces amines qui tue l'animal mais la formation continuelle de ces amines dans son organisme.

	Histamine	Tyramine	Putrescine	Cadavérine	Méthylamine	Ethylamine	Butylamine	Bétaphényl - Ethylamine	Isoamylamine	Survie en jours
24/40 B	200	800	-	-	-	0,2	-	8	1,3	2-6
968	150	120	150	175	-	0,4	-	6	-	5-12
1022 D	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-	>15
17/44	125	175	-	-	-	-	-	3,1	-	10-15
2215	445	-	-	-	-	-	0,3	-	2,3	>15
12/16 C	-	-	-	-	2	-	-	-	10,5	5-10
06/43 D	-	-	-	-	0,6	-	0,5	4	3,7	>15
9143 C	-	-	-	-	-	-	0,7	-	4,3	>15
6/33 B	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5-10
6/33 C	-	110	-	-	+	-	+	-	+	3-8
15/39 K	-	-	-	-	+	+	+	-	-	>15
9143 B	135	72	-	-	-	+	+	-	-	3-10
12/16 B	185	150	-	-	-	-	+	+	-	>15
08/7 B	172	100	-	-	-	-	-	+	-	>15
17/63	-	-	-	-	-	-	-	-	+	>15

CONCLUSIONS

1 - Inflabilis lacustris est une anaérobie gazogène dont certaines souches sont pathogènes et tuent l'animal par voie parentérale seulement et non par voie buccale. Il ne produit pas de toxine.

2 - La distillation sous pression réduite du bouillon de culture sépare les amines volatiles et concentre le bouillon qui contient les amines fixes.

3 - Amines fixes : L'électrophorèse et la chromatoïonophorèse sur papier permettent l'identification des amines fixes dans le bouillon sans extraction préalable.

4 - Amines volatiles : L'identification des amines volatiles dans le distillat s'effectue par la chromatographie sur papier tamponné et par l'électrophorèse sur papier avec des révèlateurs différents pour les amines primaires, secondaires et tertiaires.

5 - Dosage des amines :

a) L'évaluation directe des amines se fait par comparaison des taches obtenues avec des témoins connus; la précision est de $\pm$ 20%

b) Le dosage spectrophotométrique se fait après élution, avec le réactif de Pauly pour l'histamine et la tyramine, et le réactif de Moore-Stein pour les autres amines primaires et secondaires. Il est nécessaire d'établir une courbe de concentration avec chaque série de dosage. La précision est de $\pm$ 5%.

6 - L'existence de quatre amines fixes : histamine, tyramine, putrescine, cadavérine et de cinq amines volatiles : méthylamine, éthylamine, butylamine, isoamylamine et β phényléthylamine a été établie dans le bouillon de culture de certaines souches de cet anaérobie. Les amines toxiques : histamine, tyramine, putrescine et cadavérine ont été isolées des souches les plus toxiques de cet anaérobie, ce qui peut expliquer le pouvoir pathogène de ce germe par voie parentérale.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1 - PREVOT A.R.

Bactéries anaérobies pathogènes - Bactériologie Médicale - J. DUMAS et collaborateurs, 2ème Edition, Edit. Med. Flammarion, 1958

2 - PREVOT A.R.

La Putréfaction, Encyclopédie Italienne , 1953

3 - GUGENHEIM M. - BERTHELOT A. - PREVOT A.R. et KARL C.

Les amines biologiques

Librairie Baillière, Paris , 1934

4 - BLASS J. - MACHEBOEUF M. et REBEYROTTE P.

Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35 - 953

5 - BLASS J. - LECOMTE O. et POLONOWSKY J.

Bull. Soc. Chim. Biol. 1954 , 36 627

6 - BLASS J.

Bull. Soc. Chim. Biol. 1956 , 38 , 1305

7 - BLASS J. et SARRAF A. -

Journal of Chromatography, 1960 , 3 - 168

8 - WEBER R. -

Helv. Chim. Acta, 1951 , 34 - 2304

9 - HERBST A.V. - WEAVER R.H. et KEISTER E.L.
Arch. Biochem. Biophys. 1958 , 75 , 175

10 - DURRUM E.L.
J. Coll. Science, 1951 , 6 , 278

11 - DENT C.E.
Bioch. J. 1948, 43 , 169

12 - BREMMER J. et KENTEN R.H.
Bioch. J. 1951, 49, 650

13 - SCHWYZER R.
Acta Chem. Scand. 1952, 6 , 219

14 - BLACK R.J., DURRUM E.L. et ZWEIG G.
Manual of paper Chromatography and paper Electrophoris
Académie Press, New York, 1957

15 - LEDERER E.
Bull. Soc. Chim. de France, 1952, 19, 815

16 - GALE E.
Advances in Enzymology, 1946 , 1.

17 - SMITH I.
Nature, 1953 , 171 , 43

18 - ROCHE J. - FELIX W. - ROBIN I. et NGUYEN VAN THOAI
C.R. Acad. Sci., 1951 , 233 , 1683

19 - WOIWOOD J.
J. Gen. Mic., 1949, 3 , 12

20 - PREVOT A.R.

Manuel de classification et de détermination des Bactéries Anaérobies,
Masson Edit., 1957

21 - LEBERT F. et TARDIEU P.

Techniques d'isolement et de détermination des Bactéries anaérobies . Pacomby, 1952

22 - CHARGAFF E. - LEWING C. et GREEN C.

J. Biol. Chem. 1948, 175 , 67

23 - BLASS J.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 1003

24 - FRAENKEL-GOURAT H. et SINGER B.

Arch. Bioph. Bioch. 1956, 65 , 296

25 - MOORE S. et STEIN W.H.

J. Biol. Chem. 1954, 211, 907

TABLE DES MATIERES

	Pages
Préface du Professeur PREVOT	1
Intoduction	3
Description du microbe	6
Distillation	8
Amines fixes	9
Amines volatiles	18
Dosage des amines	25
Résultats	31
Conclusions	34
Index bibliographique	I

AGEMP
POLYCOPIE

8, rue Dante
PARIS-Ve

Téléphone : ODÉon 58-90